(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Juni 2003 (26.06.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/051908 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C07K 1/113

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13732

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Dezember 2002 (04.12.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 61 577.9 14. Dezember 2001 (14.12.2001) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **SCIL PROTEINS GMBH** [DE/DE]; Heinrich-Damerow-Str. 1, 06120 Halle / Saale (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **RUDOLPH, Rainer** [DE/DE]; Dr. Hans-Litten-Str. 28, 06120 Halle (DE). **LILIE, Hauke** [DE/DE]; Bruckdorfer Str. 4, 06112 Halle (DE). **RAUE, Uta** [DE/DE]; Rathenaustr. 14, 06217 Merseburg (DE).

(74) Anwalt: **BEHNISCH, Werner**; Patentanwälte Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, Friedrichstrasse 31, 80801 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR RENATURATING PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR RENATURIERUNG VON PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of substituted imidazolium salts for renaturating, for reducing the aggregation and/or for increasing the thermal stability of proteins, to a method for renaturating proteins, for reducing the aggregation and/or for increasing the thermal stability of proteins, and to renaturated proteins produced using the inventive method. According to the inventive method, the proteins to be treated are brought into contact with a liquid renaturation medium that contains substituted imidazolium salts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie ein Verfahren zur Renaturierung von Proteinen, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie renaturierte Proteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren her-gestellt wurden. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die zu behandelnden Proteine mit einem flüssigen Renaturierungsmedium, welches substituierte Imidazolium-salze enthält, in Kontakt gebracht.

WO 03/051908 A1

VERFAHREN ZUR RENATURIERUNG VON PROTEINEN

Die Erfindung betrifft die Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie ein Verfahren zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie renaturierte Proteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden.

Unter Renaturierung von Proteinen wird in diesem Zusammenhang die Gewinnung oder Wiederherstellung der biologischen Aktivität und/oder der weitgehend korrekten Faltung von Proteinen angesehen. Dem Problem der Proteinrenaturierung kommt in der Biotechnologie eine große Bedeutung zu. Aufgrund der Entwicklungen in der Molekularbiologie ist es möglich, Proteine, ausgehend von deren codierenden Sequenzen zu klonieren und rekombinant in Wirtsorganismen zu produzieren. Hierbei fallen die rekombinanten Proteinen allerdings häufig als biologisch inaktive Aggregate, den inclusion bodies, an. Das in den inclusion bodies enthaltene Protein muß anschließend durch Renaturierung in vitro in die biologisch aktive Form überführt werden.
Diese Renaturierung ist ein sehr komplexer strukturbiologischer Prozeß, der häufig nur in sehr geringen Ausbeuten an nativem Protein mündet. Bereits Steigerungen der Ausbeute an renaturiertem Protein von wenigen Prozent stellen daher eine wesentliche Verbesserung und einen wirtschaftlichen Vorteil dar.

Bei der *in vitro* Faltung von *inclusion body* Proteinen beobachtet man meist eine kinetische Konkurrenz zwischen der korrekten Faltung und unproduktiven Nebenreaktionen wie Fehlfaltung und Aggregation. Die Aggregationsprozesse beruhen meist auf hydrophoben Wechselwirkungen der weitgehend entfalteten Polypeptidketten oder nichtnativer, partiell gefalteter Intermediate. Unabhängig von ihrer molekularen Ursache weisen diese Aggregationsprozesse eine Reaktionsordnung von > 2 auf. Dementsprechend erhöht sich die Geschwindigkeit der unproduktiven Aggregationsreaktionen bei Erhöhung der Konzentration der entfalteten Polypeptidkette. Da die korrekten Faltungsprozesse meist durch Reaktionen erster Ordnung be-

stimmt werden, bedeutet dies, dass die Aggregationsreaktionen bei Erhöhung der Konzentration an denaturiertem Protein über die korrekte Faltung dominieren. Aus diesem Grund werden *in vitro* Faltungsreaktionen meist bei sehr niedriger Proteinkonzentration durchgeführt. Zusätzlich müssen physikalische Parameter wie pH, Ionenstärke, Redoxsystem und Temperatur für die Renaturierung von Proteinen optimiert werden. Allerdings führt auch dies häufig nicht zu dem gewünschten Erfolg.

Weiterhin ist schon seit langem bekannt, dass Pufferzusätze wie Harnstoff oder Guanidin in nicht denaturiender Konzentration einen positiven Einfluß auf die Faltungseffizienz haben können. Als Alternative zu Guanidin oder Harnstoff wurden auch andere chaotrope Stoffe wie Alkylharnstoff oder organische Cosolvenzien wie beispielsweise Carbonsäureamide oder alkylierte Amine bei *in vitro* Faltungsprozessen verwendet.

Im Falle der Renaturierung von humanem Gewebsplasminogenaktivator aus *E. coli inclusion bodies* wurde beobachtet, dass die Ausbeute bei der *in vitro* Faltung durch Zusatz von L-Arginin gesteigert werden kann. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch bei der *in vitro* Faltung anderer Proteine wie Antikörperfragmente oder Immunotoxine die Faltungseffizienz durch L-Arginin verbessert werden kann. Obgleich Arginin eine Guanidinogruppe enthält, wirkt es nicht so stark strukturdestabilisierend wie Guanidin. Dementsprechend erhöht Arginin vermutlich die Löslichkeit von entfalteten Polypeptidketten oder von Faltungsintermediaten, ohne dass es die native Proteinstruktur signifikant destabilisiert. Weitere Additive zur Erhöhung der *in vitro* Faltungseffizienz sind hochkonzentrierte Tris-Puffer, Polyethylenglycol oder Detergenzien. Durch Verwendung gemischter Mizellen (beispielsweise aus Triton X 100 und Phospholipiden) wurden ebenfalls verbesserte Faltungsausbeuten erzielt. Diese gemischten Mizellen enthalten sowohl polare als auch unpolare Gruppen, die vermutlich durch Wechselwirkungen mit Faltungsintermediaten deren Aggregation unterdrücken.
In der Veröffentlichung Amersham Pharmacia Biotech; Data File: Affinity Chromatography; HiTrap Chelating 1 ml und 5 ml; 18-1134-78 AB, S. 1-6; 05.2000 ist eine Renaturierung eines His_6-getaggten Proteins auf einer Ni^{2+}-NTA-Säule beschrieben. Im Renaturierungspuffer sind 20 mM Imidazol enthalten. Diese Konzentration an Imidazol unterbindet unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Säulenmatrix, bewirkt aber keine Renaturierung. Imidazol ist vielmehr als Denaturierungsmittel bekannt.

In Yeh et al., Hierachical folding of cytochrome c; Nature Struct. Biol. 7, S. 443-445, 2000, ist beschrieben, daß Imidazol die Kinetik der Faltung des Proteins Cytochrom C beschleunigen kann. Durch Imidazol wurde die intramolekulare Wechselwirkung von His33 des Proteins mit seinem kovalent gebundenen Liganden unterdrückt. Imidazol in höheren Konzentrationen wirkt grundsätzlich denaturierend auf Proteine.

Trotz einer Vielzahl von in der Literatur angegebenen Protokollen zur Renaturierung von Proteinen ist die industrielle Nutzung dieser Technik noch nicht weit vorangeschritten. Die Gründe hierfür liegen sowohl in den technischen als auch biochemischen Schwierigkeiten. Da auch unter optimalen Bedingungen die Renaturierung von Proteinen nur bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen möglich ist, erfordert eine industrielle Produktion die Aufarbeitung sehr großer Renaturierungsvolumen. Darüber hinaus ist auch unter optimierten Bedingungen die Renaturierungseffizienz vieler Proteine nur gering.

Aufgabe der Erfindung ist daher die Identifizierung von Substanzen, die die Effizienz der Proteinfaltung in vitro steigern und ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Proteine effektiv und in größerer Ausbeute als bisher renaturiert werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch die Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie durch ein Verfahren zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen, bei dem die zu behandelnden Proteine mit einem flüssigen Medium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden.

Die bevorzugte erfindungsgemäße Verwendung ist die Verwendung zur Renaturierung von Proteinen.

Unter Verminderung der Aggregation ist erfindungsgemäß zu verstehen, dass die Aggregation von Proteinen, die üblicherweise bei längeren Aufbewahrungszeiträumen in flüssigen Medien auftritt und womit ein Verlust oder eine Verminderung der biologischen Funktionsfähigkeit einhergeht, vermindert oder sogar weitgehend verhindert wird.

Unter Erhöhung der thermischen Stabilität ist erfindungsgemäß zu verstehen, dass die biologische Aktivität bzw. die korrekte Proteinfaltung auch bei Temperaturen bis weit oberhalb Raumtemperatur über längere Zeit beibehalten werden kann.

Bei den erfindungsgemäß verwendeten Imidazoliumsalzen handelt es sich bevorzugt um bei Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten. Falls es sich nicht um bei Raumtemperatur flüssige Verbindungen handelt, sollten die erfindungsgemäßen Imidazoliumsalze zumindest bei den Behandlungsbedingungen in flüssiger Form vorliegen und/oder in dem flüssigen Medium löslich sein. Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Imidazoliumsalzen ist die positive Ladung der organischen Komponente mit dem Ringsystem assoziiert und üblicherweise und bevorzugt in dem Imidazoliumring delokalisiert.

Das Verfahren beruht auf der überraschenden Entdeckung, dass substituierte Imidazoliumsalze die Aggregation von Proteinen unterdrücken und die Effizienz der Renaturierung steigern. Bisher wurden diese organischen Salze lediglich als Lösungsmittel in der organischen Synthese und der Zwei-Phasen-Katalyse eingesetzt, ein Einfluss auf strukturbildende Prozesse in der Biochemie war bislang unbekannt. Auch für andere organische Salze ist beschrieben worden, dass sie eine effizientere Renaturierung von Proteinen ermöglichen, wie z.B. 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat oder Trigonellin-Hydrochlorid (WO 99/18196). Diese Substanzen weisen bspw. keine delokalisierte positive Ladung im heterocyclischen Ringsystem auf. Im direkten Vergleich ihrer Wirkung auf die Renaturierung von Proteinen weisen die Imidazoliumderivate der vorliegenden Erfindung eine deutlich höhere Effizienz auf (vgl. auch die Ausführungsbeispiele sowie Abb. 2 und 3 mit Abb. 8 und 9).

Es ist bevorzugt, dass die Imidazoliumringe der Imidazoliumsalze der vorliegenden Erfindung durch Alkyl-, Alkenyl- Aryl- und/oder Aralkyl-Reste substituiert sind, welche wiederum durch funktionelle Gruppen substituiert sein können, bspw. durch Stickstoff-, Schwefel-, und/oder Phosphor-haltige Gruppen, wobei verschiedene Oxidationsstufen möglich sind. Erfindungsgemäß bevorzugte Beispiele für diese funktionellen Gruppen sind: Amin-, Carboxyl-, Carbonyl, Aldehyd-, Hydroxy-, Sulfat-, Sulfonat- und/oder Phosphatgruppen.

Erfindungsgemäß können ein oder beide N-Atome des Imidazoliumrings durch gleiche oder unterschiedliche Substituenten substituiert sein. Vorzugsweise sind beide Stickstoffatome des Imidazoliumrings durch gleiche oder unterschiedliche Substituenten substituiert.

Es ist erfindungsgemäß auch möglich und bevorzugt, dass die Imidazoliumsalze zusätzlich oder ausschließlich an einem oder weiteren der Kohlenstoffatome des Imidazoliumrings substituiert sind.

Als Substituenten kommen bevorzugt C_1 - C_4-Alkylreste in Frage, z.B. Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl und/oder Isobutylreste, besonders bevorzugt Ethyl- und/oder Methylreste. Ebenfalls bevorzugte Substituenten sind C_2-C_4- Alkenylreste, wie Ethylen-, n-Propylen, Isopropylen, n-Butylen und/oder Isobutylen. Bei diesen C_1-C_4-Alkylresten und C_2-C_4 Alkenylresten weisen die erfindungsgemäßen Imidazolium-verbindungen eine erfindungsgemäß besonders geeignete Wasserlöslichkeit auf, die bei längeren Alkyl- oder Alkenylketten abnimmt. Die Wasserlöslichkeit kann aber durch löslichkeitsfördernde Substituenten an den Alkyl- oder Alkenylketten wiederum verbessert werden, bspw. durch Sulfat- Sulfonat- , Amino- oder Phosphatreste. Erfindungsgemäß sind auch Alkyl und Alkenylsubstituenten mit mehr als 4 C-Atomen umfasst, wobei bspw. C_5-C_{10}-Alkyl- oder Alkenylsubstituenten ebenfalls noch bevorzugt sind. Diese C_5-C_{10}-Alkyl- oder Alkenylreste sind weiterhin bevorzugt, wenn sie ein oder mehrere weitere Substituenten an den Alkyl- und/oder Alkenylgruppen aufweisen, wie Phosphat-, Sulfonat-, Amino- und/oder Phosphatgruppen.

Als Arylsubstituenten sind erfindungsgemäß mono- und/oder bicyclische Arylreste bevorzugt, Phenyl, Biphenyl und/oder Naphthalin sowie Derivate dieser Verbindungen mit Hydroxy-, Sulfonat-, Sulfat-, Amino, Aldehyd-, Carbonyl- und/oder Carboxygruppen. Beispiele für bevorzugte Arylsubstituenten sind Phenol, Biphenyl, Biphenol, Naphthalin, Naphthalincarbonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, Biphenylole, Biphenylcarbonsäuren, Phenol, Phenylsulfonat, und/oder Phenolsulfonsäuren.

Bevorzugte Aralkylreste sind Benzyl- oder substituierte Benzylreste.

Es ist besonders bevorzugt, dass der Imidazoliumring an mindestens einem N-Atom einen Methylrest aufweist.

Die erfindungsgemäß verwendeten Imidazoliumsalze sind bevorzugt Flüssigkeiten, d.h. es handelt sich bevorzugt um bei Raumtemperatur (ca. 25°C) ionische Flüssigkeiten. Es können jedoch ebenso bei Raumtemperatur nicht flüssige Imidazoliumsalze verwendet werden, die

aber bei den Renaturierungsbedingungen in flüssiger Form vorliegen sollten bzw. in dem flüssigen Medium löslich sein sollten.

Imidazoliumsalze unterscheiden sich in ihren Eigenschaften deutlich von Imidazol. Insbesondere sind Imidazoliumsalze hydrophil, wo hingegen Imidazol hydrophob ist und dieses auf Proteine denaturierend wirkt.

Als anionische Gegenionen für die substituierten Imidazoliumringe sind erfindungsgemäß insbesondere Halogene und halogenhaltige Ionen geeigent. Besonders bevorzugt sind dabei Chlorid und Tetrafluorborat. Weiterhin bevorzugt sind Phosphat, Sulfat und Isocyanat.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt verwendbare Imidazoliumsalze sind: 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid, 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat.

Erfindungsgemäß können bevorzugt die nachfolgenden Proteinklassen und/oder Proteine renaturiert werden, deren thermische Stabilität erhöht werden und/oder deren Aggregation vermindert werden bzw. die nachfolgenden Proteine und/oder Proteinklassen können in dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt eingesetzt werden:

Proteasen, bevorzugt Serin-Proteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa, Caspasen, Cathepsine, Trypsin und Chymotrypsin, Cystein-Proteasen, saure Proteasen, wie Pepsin oder Rennin, Metallo-Proteasen, wie Thermolysin; Proteaseinhibitoren, bevorzugt Pepstatine, Antipain, Chemostatine, Elastinal, Leupeptine, Bestatin, Antithrombin III;
DNA-bindende Proteine, bevorzugt Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF Kappa B und Mitglieder der Familien Jun, Fos, Krox, Myc, E2F, virale T-Antigene;
virale Proteine, z.B. virale Hüllproteine, Kapsidproteine, virale Proteasen, Polymerasen und/oder T-Antigene;
Phosphatasen;
Proteinkinasen, bevorzugt Tyrosinkinasen und/oder Serinkinasen;
Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, z.B. Antikörper und Fragmente hiervon; Wachstumsfaktoren, z.B. epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Erythropoeietin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren I und II (IGF I und IGF II), Interlaukin-2 (IL-2), Nervenwachstumsfaktor (NGF), transformierender Wachstumsfaktor-β (TGF- β) und/oder Thrombocyten-Wachstumsfaktor (PDGF)

sowie von diesen Proteinen abgeleitete Proteine und Fragmente.

Erfindungsgemäß können disulfidfreie und disulfidverbrückte Proteine renaturiert werden und/oder deren thermische Stabilität verbessert und/oder deren Aggregation verhindert bzw. vermindert werden. Besonders bevorzugt können Mehrdomänenproteine und komplex disulfidverbrückte Proteine behandelt werden wie z.B. Lysozym, rPA (rekombinanter Plasminogenaktivator, Handelsname Replase), alpha-Glucosidase, Antikörper und von ihnen abgeleitete Fragmente und/oder Wachstumsfaktoren. Diese Proteine/Proteinklassen dienen lediglich als Beispiele, die Erfindung ist jedoch nicht auf diese Liste beschränkt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen wird als flüssiges Medium bevorzugt ein für das zu behandelnde Protein geeignetes Puffersystem eingesetzt. Als Puffersubstanzen sind Tris, Hepes, Mes, Mops, Acetat, Glycin und/oder Phosphat bevorzugt einsetzbar, wobei die Pufferkonzentration in dem flüssigen Medium bevorzugt 10 – 1000 mM, bevorzugter 5-200 mM, ebenfalls bevorzugt 10 - 200 mM und weiterhin bevorzugt 10 - 50 mM beträgt. Der pH-Wert des Puffersystems beträgt vorzugsweise 4 - 11, weiterhin bevorzugt 7,5 – 10,5. Für Lysozym beträgt der pH-Wert bei der Renaturierung vorzugsweise etwa 8, und für die Renaturierung von rPA beträgt der pH-Wert vorzugsweise etwa 10,5. Für andere zu renaturierende Proteine können die Pufferzusammensetzungsparameter individuell angepaßt und optimiert werden, so dass eine maximale Ausbeute an renaturiertem Protein erhalten wird.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Renaturierung von Proteinen erfolgt das Inkontaktbringen der zu reanurierenden bzw. zu behandelnden Proteine mit dem flüssigen Medium bevorzugt, indem das zu behandelnde Protein mit dem flüssigen Medium verdünnt, dialysiert und/oder diafiltriert wird. Grundsätzlich sollte bei einer Renaturierung eine Umpufferung des denaturierten Proteins in den Renaturierungspuffer gewährleistet sein.

Beim Inkontaktbringen, insbesondere bei der Renaturierung, beträgt die Proteinkonzentration des zu behandelnden Proteins bevorzugt 5 - 500 µg/ml, bevorzugt 10 - 100 µg/ml, noch bevorzugter ungefähr 50 - 100 µg/ml. Diese Werte können von einem Fachmann für das jeweilige zu renaturierende bzw. zu behandelnde Protein an die Löslichkeitseigenschaften des Proteins angepasst werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Renaturierung von disulfidfreien und disulfidverbrückten Proteinen. Dabei werden disulfidfreie Proteine bevorzugt in Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie DDT, DTE und/oder Cystein, bevorzugt in einer Konzentration von 1 – 10 mM, mit dem Renaturierungsmedium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht.

Bei der Renaturierung disulfidverbrückter Proteine werden diese bevorzugt in Gegenwart eines Redoxsystems aus reduzierten und oxidierten Thiolsubstanzen wie DTT, DTE, Glutathion, Cystein, Mercaptoethanol, bevorzugt in einer Konzentration von 1 – 10 mM, in Kontakt gebracht. Die Konzentrationsverhältnisse von reduzierten Substanzen zu oxidierten Substanzen ("reduziert : oxidiert") betragen dabei vorzugsweise 1:10 bis 20:1, bevorzugt 1:5 – 10 :1, weiterhin bevorzugt 1:1 bis 5:1.

Die Konzentration an substituierten Imidazoliumsalzen beträgt beim Inkontaktbringen, insbesondere bei der Renaturierung, bezogen auf das Renaturierungsmedium, bevorzugt 5 - 95 Vol.-%, weiterhin bevorzugt 5 - 50 Vol.-%, weiterhin bevorzugt 10 - 40 Vol.-%. Auch hier kann die optimale Konzentration für das jeweilige Protein durch einfache Versuche ermittelt werden. Üblicherweise ergibt der Zusatz von substituierten Imidazoliumsalzen in einem Anteil von 10 - 40 Vol.-% die besten Renaturierungsausbeuten. Wie bereits erwähnt, kann jedoch, abhängig von den jeweils eingesetzten Imidazoliumverbindungen, die Konzentration bis zu 95 Vol.-% betragen.

In Molaritäten ausgedrückt entsprechen die oben genannten Vol.-% Angaben von 10 – 40 Vol.-% etwa 0,5 – 3 M: Für den Fall von 1-Ethyl-3-Methyl-Imidazoliumchlorid genau 0,68 – 2,73 M. In Molaritäten ausgedrückt, ist daher erfindungsgemäß bevorzugt, daß die Molaritäten substituierter Imidazoliumsalze, bezogen auf das Renaturierungsmedium, etwa 0,25 - 5 M betragen, weiterhin bevorzugt 0,25 – 3,5 M und am bevorzugtesten etwa 0,5 – 3 M.

Die Renaturierungsdauer beträgt üblicherweise bevorzugt: 0,1 –100 h, weiterhin bevorzugt 1 –50 h, noch bevorzugter ungefähr 2-20 h.

Die Renaturierung erfolgt vorzugsweise bei niedrigen Temperaturen von 0 - 37°C, bevorzugt 5 - 15°C, da bei höheren Temperaturen die Aggregationsreaktionen zunehmen.

Als Parameter der Optimierung der Renaturierung können bevorzugt die biologische Aktivität des Proteins und das Aggregationsverhalten über den Prozeßverlauf gemessen werden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das Protein pulsweise mehrfach hintereinander oder kontinuierlich dem Renaturierungspuffer zugegeben werden.

Insgesamt ist das erfindungsgemäße Verfahren besonders vorteilhaft zur Renaturierung von Proteinen geeignet. Dabei ist es weiterhin bevorzugt, dass das flüssige Medium für die Renaturierung von Proteinen neben den substituierten Imidazoliumsalzen weitere bekannte Renaturierungssubstanzen oder die Renaturierung unterstützende Substanzen enthält, wie z.B. Harnstoff, Guanidin, L-Arginin, Alkylharnstoff, Carbonsäureamide, alkylierte Amine, Tris-Puffer, Polyethylenglykol und/oder Detergenzien.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben. Dabei wird auf die folgenden Figuren Bezug genommen:

Figur 1: zeigt die Renaturierungsausbeute in % für Lysozym in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat;

Figur 2: zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat;

Figur 3: zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid;

Figur 4: zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat;

Figur 5: zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat;

Figur 6: ist eine graphische Darstellung der Aggregation von rPA während der Renaturierung, bestimmt mittels Lichtstreuung, wobei 0% und 5% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, enthalten sind.

Figur 7: zeigt die Konzentration an gelöstem nGLP1R bei Abwesenheit und in Gegenwart von 5 % 1-Ethyl-3-methyl-imidazoliumchlorid.

Figur 8: ist eine graphische Darstellung des Aggregationsverhaltens von rPA in Abhängigkeit der Temperatur und für verschiedene Konzentrationen an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, bestimmt mittels Lichtstreuung;

Figur 9: zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat;

Figur 10: zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an Trigonellin-hydrochlorid;

Beispiel 1: Denaturierung von Proteinen

Lysozym, rPA oder inclusion body Proteine werden mit einer Proteinkonzentration von 0,5 – 20 mg/ml in 0,1 M Tris, pH 8, 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 mM EDTA, 200 mM DTT für mindestens 2 h bei Raumtemperatur denaturiert und reduziert. Anschließend wird der pH-Wert durch Zugabe von HCl auf ca. pH 2 abgesenkt. Wahlweise kann das denaturierte Protein gegen das 1000fache Volumen 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 2 dialysiert werden. Die Konzentration des denaturierten Proteins wird mit Hilfe des Bradford-Assay (Bradford, 1976) oder spektroskopisch bestimmt. Hierfür wird für rPA ein Extinktions-koeffizient von e(1mg/ml, 280 nm, 1 cm) = 1 und für Lysozym e(1mg/ml, 280 nm, 1cm) = 2,37 verwendet.

Beispiel 2: Renaturierung von Lysozym

Die Renaturierung von Lysozym erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung des denaturiert, reduzierten Proteins in den auf 10°C vortemperierten Renaturierungspuffer, die Endkonzentration des Proteins beträgt 200 µg/ml. Als Renaturierungspuffer wird 0.05 M Tris, pH 8, 1 mM ED-

TA, 4 mM GSSG (oxidiertes Glutathion) und unterschiedliche Konzentrationen der ionischen Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat eingesetzt. Als Reduktionsmittel dient 2 mM DTT, welches durch die Verdünnung aus dem Denaturierungsansatz eingeschleppt wird. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,05 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von Lysozym photometrisch gemessen und anhand einer Eichgerade quantifiziert.

In Figur 1 ist die Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von Lysozym von der Konzentration des Salzes 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat dargestellt. In Gegenwart von 10 – 15 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat kann Lysozym quantitativ, also zu 100%, oxidativ renaturiert werden.

Beispiel 3: Renaturierung von rPA mittels 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH (reduziertes Glutathion) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

In Figur 2 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat dargestellt. Die Renaturierungsausbeute liegt bei 23 % in Gegenwart von 20 – 30 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat.

Beispiel 4: Renaturierung von rPA mittels 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid. Die Renaturie-

rung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

In Figur 3 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid dargestellt. Die Renaturierungsausbeute liegt bei 26 % in Gegenwart von 20 - 25 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid.

Beispiel 5: Renaturierung von rPA mittels 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat (Vergleichsbeispiel)

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,01 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

In Figur 4 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat dargestellt. Mit steigender Konzentration an 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat steigt die Renaturierungsausbeute von rPA. Bei einer Konzentration von 94 % (v/v) 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat liegt die Ausbeute an renaturiertem rPA bei 13,5 %.

Beispiel 6: Renaturierung von rPA mittels 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden

die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

In Figur 5 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat dargestellt. Die Renaturierungsausbeute liegt bei 8 % in Gegenwart von 20 % (v/v) 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat.

Beispiel 7: Aggregation von rPA während der Renaturierung

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in An- oder Abwesenheit von 5 % 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat. Die Reaktion wird bei 10°C in einer rührbaren Fluoreszenzküvette durchgeführt. Während der Kinetik wird die Aggregation des Proteins durch Messung der Lichtstreuung bei 360 nm Anregung und 360 nm Emission aufgezeichnet.

In Figur 6 ist der pufferkorrigierte Plateauwert der Aggregationsmessungen von der rPA-Renaturierung in Abwesenheit des Salzes (offener Balken) und in Gegenwart von 5 % Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat (gefüllter Balken) dargestellt. In Gegenwart von mindestens 5 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat wird die Aggregation des zu renaturierenden rPA's nahezu vollständig unterdrückt.

Beispiel 8: Löslichkeit der N-terminalen Domäne des GLP1-Rezeptors (nGLP1R)

Die nativ strukturierte Rezeptordomäne wurde in 0,4 M Kaliumphosphat, pH 6,3, 0,4 M Ammoniumsulfat, 20°C in An- und Abwesenheit von 5 % 1-Ethyl-3-Methyl-imidazolium chlorid bei verschiedenen Proteinkonzentrationen über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proteinaggregate bei 70 000 rpm abzentrifugiert und der Anteil des löslichen Proteins mittels Absorptionsspektroskopie bei 280 nm quantifiziert. In Figur 7 sind die bei den jeweiligen Bedingungen maximal erreichbaren Konzentrationen an löslichem Protein gegenübergestellt.

Das Beispiel zeigt damit die Erhöhung der Löslichkeit bzw. der Verminderung der Aggregation durch substituierte Imidazoliumsalze.

Beispiel 9: Thermische Stabilität von rPA

Natives rPA in einer Konzentration von 20 µg/ml in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat wird mit einer Heizrate von ca. 0,3°C/min von 20°C bis 90°C aufgeheizt. Während dieses Vorganges wird der Aggregationszustand des Proteins mittels Lichtstreuung analysiert. Hierzu wird die Probe in einem Fluorimeter bei 360 nm angeregt und das Signal ebenfalls bei 360 nm detektiert.

In Figur 8 ist das Aggregationsverhalten von rPA während thermischer Denaturierung dargestellt (gefüllte Kreise Vol.-0 %, gefüllte Dreicke 5 Vol.-%, offene Kreise 12 Vol.-%, offene Dreiecke 20 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat). Die Aggregation von rPA in Abwesenheit von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat setzt bei 55°C ein. In Gegenwart von 5 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat ist eine verstärkte Aggregation erst oberhalb von 80°C zu beobachten, bei höheren 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat-Konzentrationen tritt bis 90°C keine messbare Aggregation auf.

Beispiel 10: Renaturierung von rPA mit 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat (Vergleichsbeispiel)

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

In Figur 9 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat dargestellt. Die maximale Renaturierungsausbeute liegt bei 18 % in Gegenwart von 30 Vol.-% 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat.

Beispiel 11: Renaturierung von rPA mit Trigonellin-Hydrochlorid (Vergleichsbeispiel)

Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Trigonellin-Hydrochlorid. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

In Figur 10 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes Trigonellin-Hydrochlorid dargestellt. Es ist keine verbesserte Renaturierung von rPA in Gegenwart des Salzes zu beobachten.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder zur Verminderung der Aggregation von Proteinen.

2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Imidazoliumsalze durch Alkyl-, Alkenyl- Aryl-und/oder Aralkyl-Reste substituiert sind, welche wiederum durch funktionelle Gruppen substituiert sein können, bevorzugt durch Stickstoff-, Schwefel-, und/oder Phosphor-haltige Gruppen.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Imidazoliumsalze an beiden Stickstoffatomen des Imidazoliumrings substituiert sind.

4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Imidazoliumsalze an einem oder mehreren der Kohlenstoffatome des Imidazoliumrings substituiert sind.

5. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Imidazoliumring als Substituenten $C_1 - C_4$-Alkylreste, bevorzugt Methyl-, und/oder Ethylreste, $C_1 - C_4$-Alkenylreste und/oder mono- oder bicyclische Arylreste aufweist.

6. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Imidazoliumring an mindestens einem der N-Atome einen Methylrest aufweist.

7. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

dass der Imidazoliumring einen oder mehrere der nachfolgenden Substituenten aufweist: Phenol, Biphenyl, Biphenol, Naphthalin, Naphthalincarbonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, Biphenylole, Biphenylcarbonsäuren, Phenol, Phenylsulfonat, Phenolsulfonsäuren und/oder substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl.

8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten weiterhin durch ein oder mehrere der nachfolgenden Reste substituiert sind: Amine, Carboxyl-, Carbonyl-, Aldehyd-, Hydroxy-, Sulfat-, Sulfonat- und/oder Phosphat-Reste.

9. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Imidazoliumsalzen um bei Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten handelt.

10. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, zur Renaturierung, Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder Verminderung der Aggregation von:
Proteasen, bevorzugt Serin-Proteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa, Caspasen, Cathepsine, Trypsin und/oder Chymotrypsin, Cystein-Proteasen, sauren Proteasen, wie Pepsin oder Rennin, Metallo-Proteasen, wie Thermolysin;
Protease-inhibitoren, bevorzugt Pepstatine, Antipain, Chemostatine, Elastinal, Leupeptine, Bestatin, Antithrombin III;
DNA-bindenden Proteinen, bevorzugt Transkriptionsfaktoren; insbesondere NF Kappa B und Mitglieder der Familien Jun, Fos, Krox, Myc, E2F und/oder virale T-Antigene;
virale Proteine, wie virale Hüllproteine, Kapsidproteine, virale Proteasen, Polymerasen und/oder T-Antigene;
Phosphatasen;
Proteinkinasen, bevorzugt Tyrosinkinasen und/oder Serinkinasen;
Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie, z.B. Antikörper und Fragmente hiervon;
Wachstumsfaktoren, bevorzugt epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Erythropoeietin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren I und II (IGF

I und IGF II), Interleukin-2 (IL-2), Nervenwachstumsfaktor (NGF), transformierender Wachstumsfaktor-β (TGF- β) und/oder Thrombocyten-Wachstumsfaktor (PDGF); Lysozym, rPA, alpha-Glucosidase
sowie von diesen Proteinen abgeleitete Proteine und Fragmente.

11. Verfahren zur Renaturierung, Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder Verminderung der Aggregation von Proteinen,
dadurch gekennzeichnet,
dass die zu behandelnden Proteine mit einem flüssigen Medium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11 zur Renaturierung von Proteinen, wobei als flüssiges Medium ein flüssiges Renaturierungsmedium eingesetzt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass als flüssiges Medium ein für das zu behandelnde Protein geeignetes Puffersystem eingesetzt wird.

14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-13,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Puffersubstanzen Tris, HEPES, Mes, Mops, Acetat, Glycin und/oder Phosphat eingesetzt werden.

15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-14,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Pufferkonzentration in dem flüssigen Medium 10 bis 1000 mM beträgt, bevorzugt, 5 –200 mM, noch bevorzugter 10 – 50 mM.

16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-15,
dadurch gekennzeichnet,
dass der pH-Wert des Puffersystems 4-11, bevorzugt 7,5 – 10,5 beträgt.

17. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-16,

dadurch gekennzeichnet,
dass die Imidazoliumsalze Alkyl-, Alkenyl- Aryl-und/oder Aralkyl-Reste substituiert sind, welche wiederum durch funktionelle Gruppen substituiert sein können, bevorzugt durch Stickstoff-, Schwefel-, und/oder Phosphor-haltige Gruppen.

18. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Imidazoliumsalze an beiden Stickstoffatomen des Imidazoliumrings substituiert sind.

19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-18,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Imidazoliumsalze an einem oder mehreren der Kohlenstoffatome des Imidazoliumrings substituiert sind.

20. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-19,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Imidazoliumring als Substituenten $C_1 - C_4$-Alkylreste, bevorzugt Methyl-, und/oder Ethylreste, $C_1 - C_4$-Alkenylreste und/oder mono- oder bicyclische Arylreste aufweist.

21. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-20,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Imidazoliumring an mindestens einem der N-Atome einen Methylrest aufweist.

22. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-21,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Imidazoliumring einen oder mehrere der nachfolgenden Substituenten aufweist: Phenol, Biphenyl, Biphenol, Naphthalin, Naphthalincarbonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, Biphenylole, Biphenylcarbonsäuren, Phenol, Phenylsulfonat, Phenolsulfonsäuren und/oder substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl.

23. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-22,
dadurch gekennzeichnet,

dass die Substituenten weiterhin durch ein oder mehrere der nachfolgenden Reste substituiert sind: Amine, Carboxyl-, Carbonyl-, Aldehyd-, Hydroxy-, Sulfat-, Sulfonat- und/oder Phosphat-Reste.

24. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-23, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Imidazoliumsalzen um bei Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten handelt.

25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-24, dadurch gekennzeichnet, dass das Inkontaktbringen erfolgt, indem das zu behandelnde Protein mit dem flüssigen Medium verdünnt, dialysiert und/oder diafiltriert wird.

26. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-25, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteinkonzentration des zu behandelnden Proteins beim Inkontaktbringen 5 – 500 µg/ml, bevorzugt 10 - 200 µg/ml, noch bevorzugter ungefähr 50-100 µg/ml, beträgt.

27. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-26, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration an substituierten Imidazoliumsalzen, bezogen auf das flüssige Medium, 5 – 95 Vol.-% beträgt, bevorzugt 5 - 50 Vol.-%, am bevorzugtesten 10 – 40 Vol.-%.

28. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-27, dadurch gekennzeichnet, daß die Molarität an substituierten Imidazoliumsalzen, bezogen auf das flüssige Medium, 0,25 - 5 M beträgt, bevorzugt 0,25 – 3,5 M, am bevorzugtesten 0,5 – 3 M.

29. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-28, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren durchgeführt wird, indem das zu renaturierende Protein dem Renaturierungsmedium mehrfach nacheinander oder kontinuierlich zugeführt wird.

30. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-29,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Inkontaktbringen der zu renaturierenden Proteine mit dem Renaturierungsmedium für 0,1 – 100 h, bevorzugt, 1 – 50 h, noch bevorzugter 5 - 20 h erfolgt.

31. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-30,
zur Renaturierung, Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder Verminderung der Aggregation von:
Proteasen, bevorzugt Serin-Proteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa, Caspasen, Cathepsine, Trypsin und/oder Chymotrypsin, Cystein-Proteasen, sauren Proteasen, wie Pepsin oder Rennin, Metallo-Proteasen, wie Thermolysin;
Protease-inhibitoren, bevorzugt Pepstatine, Antipain, Chemostatine, Elastinal, Leupeptine, Bestatin, Antithrombin III;
DNA-bindenden Proteinen, bevorzugt Transkriptionsfaktoren; insbesondere NF Kappa B und Mitglieder der Familien Jun, Fos, Krox, Myc, E2F, virale T-Antigene;
virale Proteine, wie virale Hüllproteine, Kapsidproteine, virale Proteasen, Polymerasen und/oder T-Antigene;
Phosphatasen;
Proteinkinasen, bevorzugt Tyrosinkinasen und/oder Serinkinasen;
Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie, z.B. Antikörper und Fragmente hiervon;
Wachstumsfaktoren, bevorzugt epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Erythropoeietin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren I und II (IGF I und IGF II), Interleukin-2 (IL-2), Nervenwachstumsfaktor (NGF), transformierender Wachstumsfaktor-β (TGF- β) und Thrombocyten-Wachstumsfaktor (PDGF);
Lysozym, rPA, alpha-Glucosidase
sowie von diesen Proteinen abgeleitete Proteine und Fragmente.

32. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-31,
dadurch gekennzeichnet,
dass disulfidfreie Proteine renaturiert werden,
wobei das Inkontaktbringen des disulfidfreien Proteins mit dem Renaturierungsmedium in Gegenwart eines Reduktionsmittels erfolgt, vorzugsweise DTT, DTE und/oder Cystein.

33. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-32,
dadurch gekennzeichnet,
dass disulfidverbrückte Proteine renaturiert werden,
wobei das Inkontaktbringen des disulfidverbrückten Proteins mit dem Renaturierungsmedium in Gegenwart eines Redoxsystems aus oxidierten und reduzierten Thiolsubstanzen wie DTT, DTE, Glutathion, Cystein und/oder Mercaptoethanol erfolgt.

34. Verfahren nach Anspruch 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Konzentrationsverhältnis von reduzierten Substanzen zu oxidierten Substanzen 1:10 bis 20:1, bevorzugt 1:5 bis 10 :1, weiterhin bevorzugt 1:1 bis 5:1, beträgt.

35. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 – 34,
dadurch gekennzeichnet,
dass das flüssige Medium zur Renaturierung von Proteinen weitere Renaturierungssubstanzen enthält, bevorzugt Harnstoff, Guanidin, L-Arginin, Alkylharnstoff, Carbonsäureamide, alkylierte Amine, Tris-Puffer, Polyethylenglykol und/oder Detergenzien.

36. Renaturiertes Protein, hergestellt nach einem Verfahren der Ansprüche 11-35.

Fig. 1

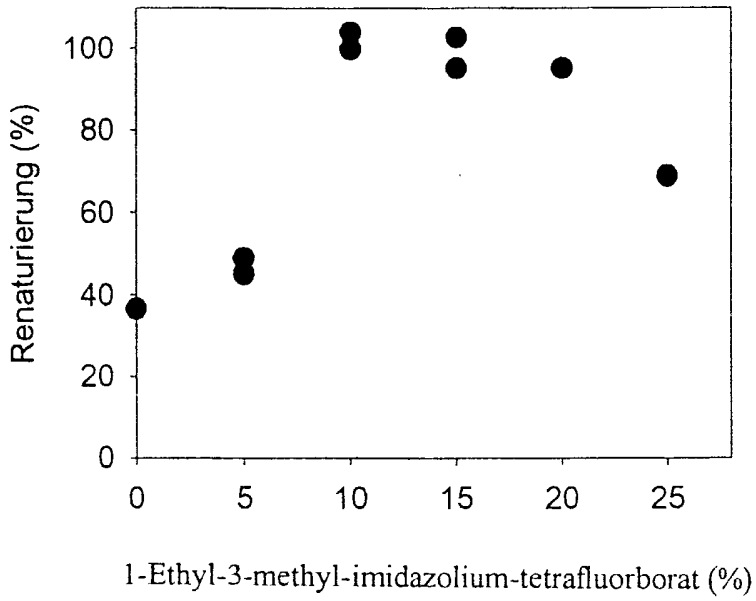

Renaturierung (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat (%)

Fig. 2

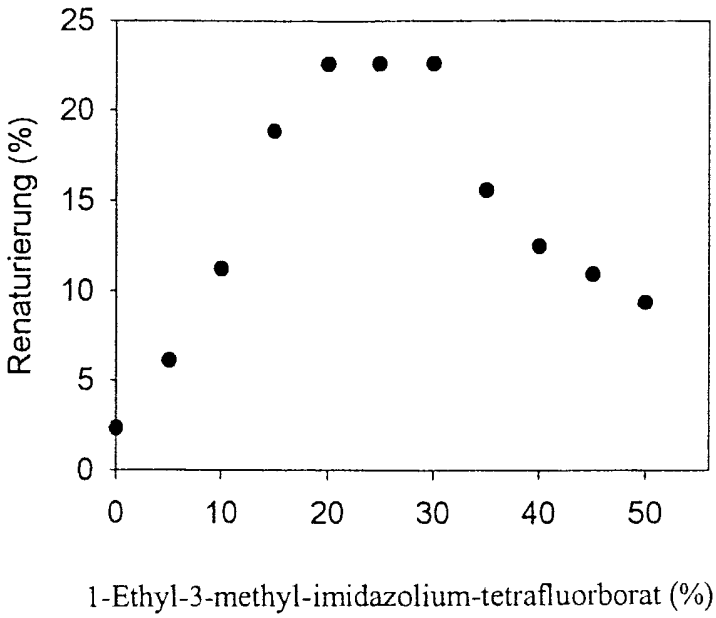

Renaturierung (%)
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
50
1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat (%)

Fig. 3

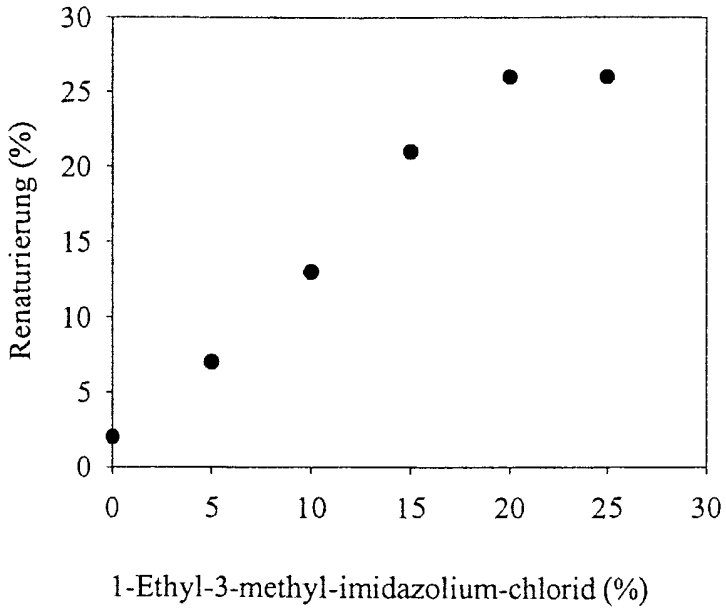

Renaturierung (%)
0
5
10
15
20
25
30
1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid (%)

Fig. 4

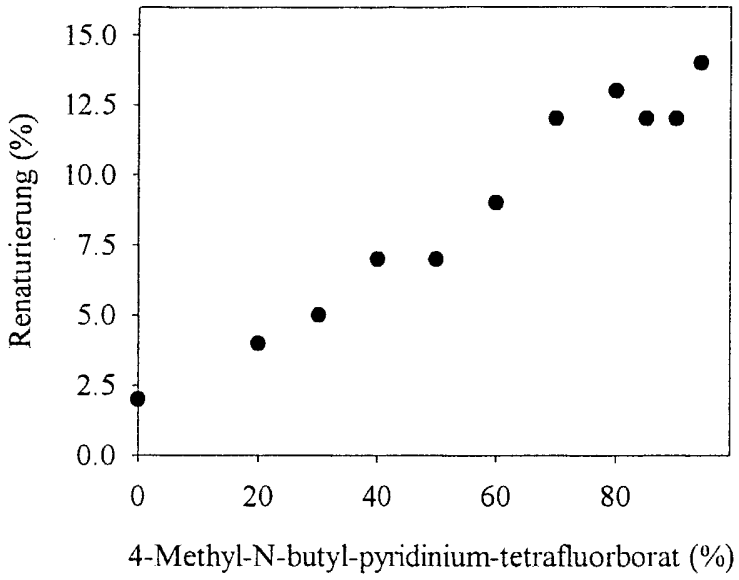

15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Renaturierung (%)
0
20
40
60
80
4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat (%)

Fig. 5

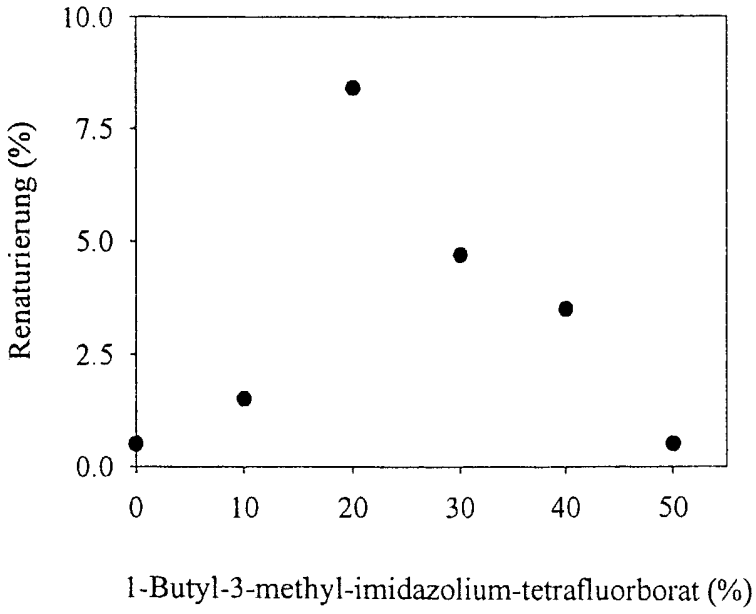

10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Renaturierung (%)
0
10
20
30
40
50
1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat (%)

Fig. 6

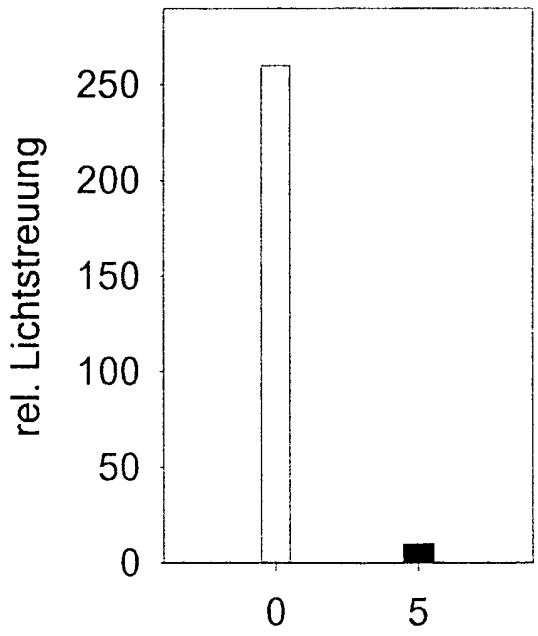

rel. Lichtstreuung
250
200
150
100
50
0
0
5
1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat (%)

Fig. 7

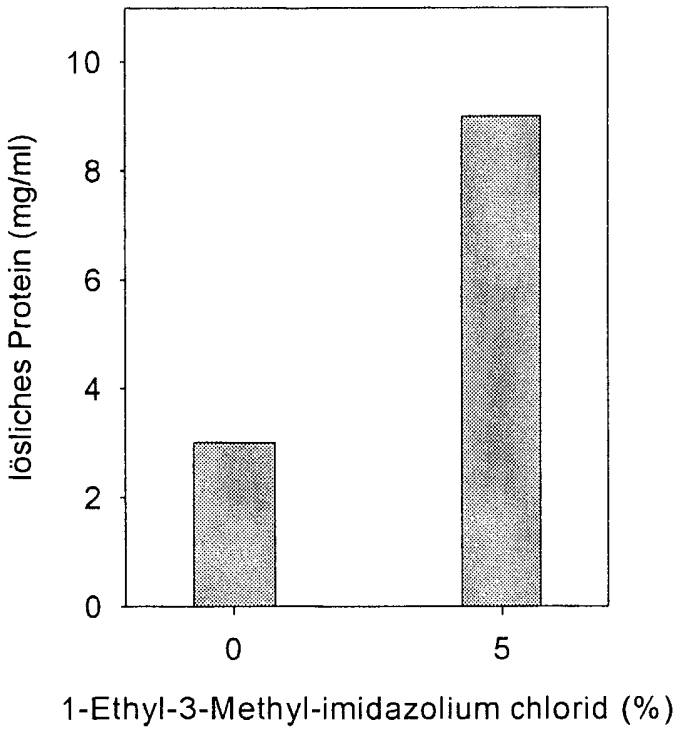

10
8
6
4
2
0
lösliches Protein (mg/ml)
0
5
1-Ethyl-3-Methyl-imidazolium chlorid (%)

Fig. 8

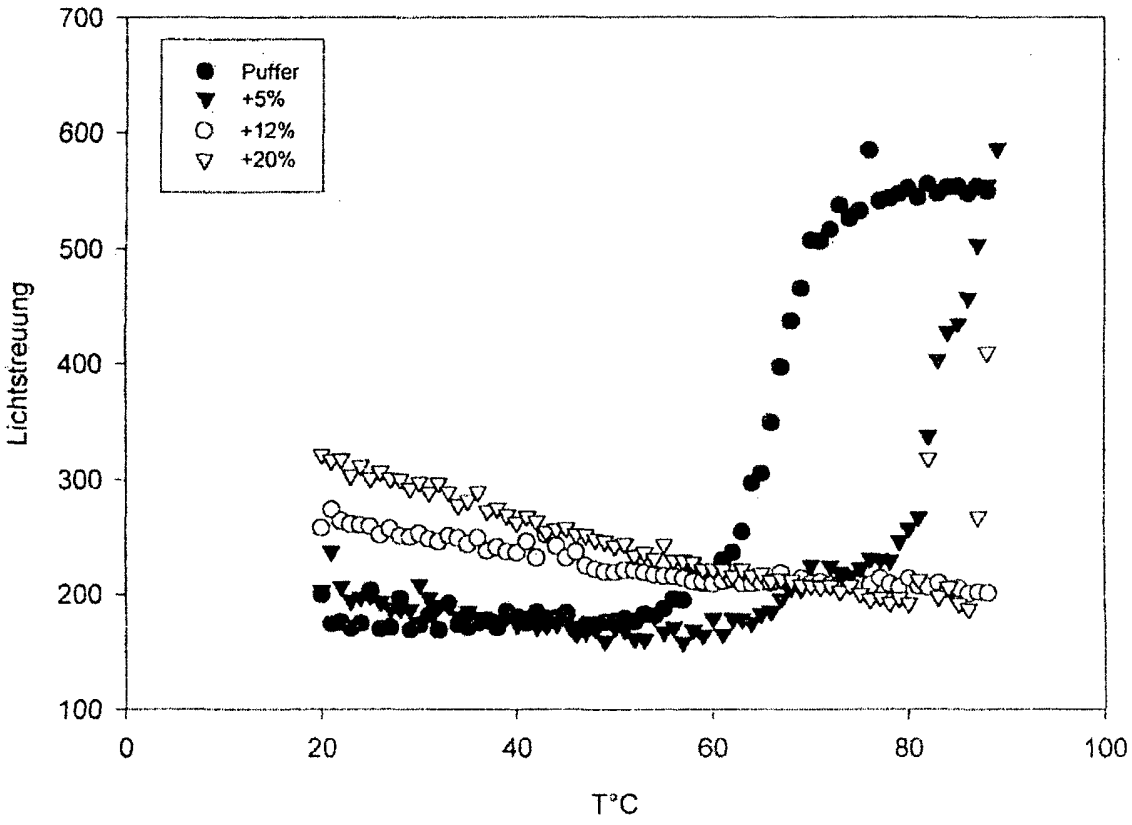

Puffer
+5%
+12%
+20%
Lichtstreuung
T°C
700
600
500
400
300
200
100
0
20
40
60
80
100

Fig. 9

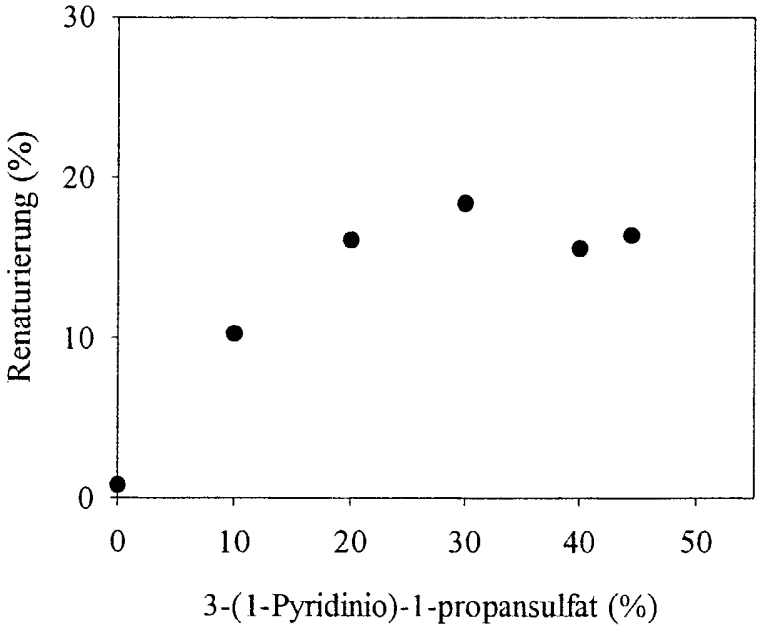
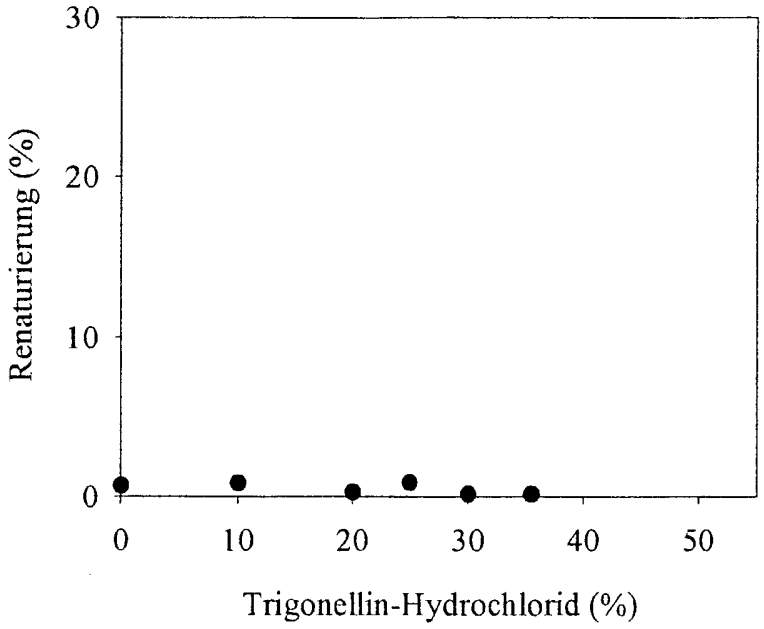

30
20
10
0
Renaturierung (%)
0
10
20
30
40
50
3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat (%)

Fig. 10


30
20
10
0
Renaturierung (%)
0
10
20
30
40
50
Trigonellin-Hydrochlorid (%)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K1/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 961 969 A (HERSHENSON SUSAN ET AL) 9 October 1990 (1990-10-09) the whole document ---	1-36
A	RUDOLPH R ET AL: "IN VITRO FOLDING OF INCLUSION BODY PROTEINS" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, vol. 10, no. 1, 1996, pages 49-56, XP000605154 the whole document --- -/--	1-36

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 April 2003	08/05/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Kalsner, I

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YEH S R ET AL: "Hierarchical folding of cytochrome c." NATURE STRUCTURAL BIOLOGY. UNITED STATES JUN 2000, vol. 7, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 443-445, XP009009665 cited in the application the whole document	1-36
A	REHM BERND H A ET AL: "Matrix-assisted in vitro refolding of Pseudomonas aeruginosa class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant Escherichia coli." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 358, no. 1, 2001, pages 263-268, XP002238953 page 264, left-hand column, paragraph 4 -page 264, right-hand column, paragraph 2	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13732

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4961969 A	09-10-1990	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTE

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/13732

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K1/113

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 961 969 A (HERSHENSON SUSAN ET AL) 9. Oktober 1990 (1990-10-09) das ganze Dokument ---	1-36
A	RUDOLPH R ET AL: "IN VITRO FOLDING OF INCLUSION BODY PROTEINS" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, Bd. 10, Nr. 1, 1996, Seiten 49-56, XP000605154 das ganze Dokument --- -/--	1-36

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
22. April 2003	08/05/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Kalsner, I

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YEH S R ET AL: "Hierarchical folding of cytochrome c." NATURE STRUCTURAL BIOLOGY. UNITED STATES JUN 2000, Bd. 7, Nr. 6, Juni 2000 (2000-06), Seiten 443-445, XP009009665 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-36
A	REHM BERND H A ET AL: "Matrix-assisted in vitro refolding of Pseudomonas aeruginosa class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant Escherichia coli." BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 358, Nr. 1, 2001, Seiten 263-268, XP002238953 Seite 264, linke Spalte, Absatz 4 -Seite 264, rechte Spalte, Absatz 2 -----	1-36

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTE

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/13732

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4961969 A	09-10-1990	KEINE	