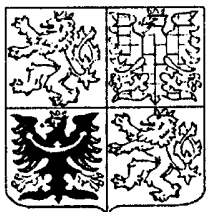


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 23.06.93

(32) 23.06.92

(31) 92/0825

(33) DK

(40) 14.06.95

(21) 3285-94

(13) A3

6(51)

C 07 K 1/18

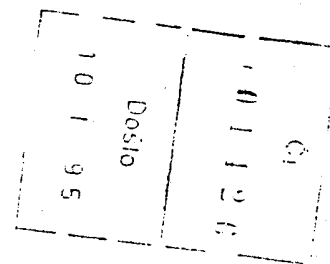
(71) NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Johannessen Marie, Birkerød, DK;
Halkjaer Erik, Kobenhavn, DK;
Petersen Lars Christian, Horsholm, DK;

(54) Čištění proteinů obsahujících kringl, zvláště t-PA

(57) Při čištění proteinů obsahujících kringl z roztoku proteinů, který obsahuje tyto proteiny, se proteiny obsahující kringl, které mají schopnost vázat se na x-aminokyseliny, selektivně eluují z kolony ionexu těmito x-amino-kyselinami.

Čištění proteinů obsahujících kringl, zvláště t-PA



Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu čištění proteinů obsahujících kringl z roztoku proteinů, který obsahuje tyto proteiny obsahující kringl. Podle tohoto způsobu se proteiny obsahující kringl, které mají schopnost vázat se na ω -aminokyseliny, selektivně eluují z kolony ionexu těmito ω -aminokyselinami.

Dosavadní stav techniky

Čištění proteinů, zvláště proteinů, o kterých se uvažuje jako proteinech použitelných pro léčení, je citlivý proces. Výchozími materiály pro čištění budou typicky biologické kapaliny, jako je plasma nebo serum, buněčné lysáty nebo kultivační media, pokud se protein připravuje kultivací buněčné linie schopné produkovat tento protein. Bez ohledu na zdroj výchozího materiálu, tento materiál normálně obsahuje četné nechtěné proteiny a další materiály, od nichž se musí žádaný protein oddělit. Mezi tradiční stupně čištění patří oddělení zbytků buněk nebo podobných materiálů filtrací nebo odstřeďováním, vysrážení proteinového materiálu a rozdělení proteinového materiálu, čímž se získá roztok proteinů, který obsahuje žádaný protein, avšak stále ještě znečištěný jinými proteiny. Tento roztok proteinů se pak typicky nanese na vhodné čisticí kolony, jako jsou kolony pro afinitní chromatografii nebo chromatografii na iontoměniči nebo na podobné.

Afinitní chromatografie je vhodná pro čištění v malém měřítku, například pro výzkumné účely. Pro komerční přípravu ve velkém měřítku je však méně přitažlivá vzhledem k vysoké ceně materiálu kolony, ale vzhledem také k neuspokojivé chemické stabilitě tohoto materiálu. Po jisté době používání bude materiál kolony znečištěn a protože se nedá regenerovat, musí se často nahrazovat novým materiálem, který zvyšuje cenu výroby.

Kolony pro afinitní chromatografii tedy nejsou nijak zvlášť vhodné pro počáteční stupně čištění ve velkém měřítku, jestliže je přítomno mnoho nečistot.

Při čištění proteinů ve velkém měřítku je výhodné, aby v počátečních stupních byl používán takový materiál kolony, který má nízkou cenu a dobrou chemickou a fyzikální stabilitu. Tento materiál by měl být také schopen odolávat vysokým průtokům, například 10 až 20 objemů kolony za hodinu. Tato kritéria typicky splňují kolony s iontoměničem.

Tradiční způsob eluce proteinů z iontoměničové kolony je změnou pH nebo iontové síly nebo obou. Žádaný produkt a nečistoty se pak objeví v různých eluátech podle, mimo jiné, jejich isoelektrického bodu (pI). Jestliže žádaný protein a nečistoty, které se musí oddělit, mají pI ve stejném rozmezí, tato eluce může být nespecifická, protože proteiny s podobnými hodnotami pI budou do jistého stupně eluovány z kolony společně. Mohou být tedy nutné další stupně čištění s další spotřebou času a zvýšením ceny a také s rizikem zvýšené degradace a ztráty žádaného proteinu.

V evropském patentu 0 256 836 B je popsán způsob čištění t-PA, při kterém se směs částic t-PA s různými molekulovými hmotnostmi oddělují po tom, co se směs uvede do kontaktu s hydroxyapatitem a různé frakce se postupně eluují při různých pH, koncentracích solí nebo obojím. Tento způsob má tedy shora uvedené nedostatky. Totéž platí u způsobu popsaného v evropské patentové přihlášce 0 261 941 A, podle níž se t-PA vyčistí na koloně s katexem elucí solným gradientem. Japonská patentová přihláška č. 63-091080 popisuje způsob čištění t-PA adsorbováním t-PA na adsorpčním nosiči, jako je sklo o regulované velikosti porů (CPG), silikagel nebo křemelina, eluce se provádí roztokem obsahujícím ω -aminokyselinu. Adsorpční matrice se podstatně liší od materiálu iontoměniče. Při adsorpční chromatografii jsou zpoždovacími silami na maticích převážně povrchová energie a Van der Waalsovy síly a dělení závisí na polárních a sterických

faktorech. Při iontoměničové chromatografii jsou zpoždovacími silami převážně síly elektrostatické a dělení závisí na iontové povaze složek.

Problém, se kterým se setkáváme u známých způsobů, může být vyřešen, jestliže protein, o který se zajímáme, lze eluovat z iontoměničové kolony elučním činidlem, které je schopno selektivně eluovat žádaný protein z iontoměničové kolony bez měnění pH a iontové síly v kterémkoliv podstatném stupni během eluce. Jestliže je to možné, eluuje se pouze protein, o který máme zájem, zatímco nečistoty zůstanou na koloně.

Tento vynález je založen na skutečnosti, že překvapivě bylo ukázáno, že jistý typ aminokyselin, tak zvané ω -aminokyseliny mají žádoucí vlastnosti. Zvláště bylo ukázáno, že lys-plasminogen, derivát plasminogenu, se může selektivně eluovat z kolony s S-sepharosou ϵ -aminokapronovou kyselinou (6-AHA) ve vysokých výtěžcích.

Podstata vynálezu

Ve svém nejširším aspektu se tento vynález týká způsobu čištění proteinů obsahujících kringl, které jsou schopny vázat se na ω -aminokyseliny z roztoku proteinů, které obsahují protein obsahující kringl. Tento způsob se vyznačuje tím, že zahrnuje následující stupně:

a) roztok proteinů se nanese na iontoměničovou kolonu za takových podmínek, aby se protein obsahující kringl navázal na materiál kolony,

b) protein obsahující kringl se selektivně eluuje působením ω -aminokyseliny bez toho, aby se podstatným způsobem změnilo pH nebo iontová síla a

c) protein obsahující kringl se izoluje z eluátu ze stupně b) dalšími vhodnými čistícími stupni.

V užším aspektu se tento vynález týká způsobu čištění plas-

minogenu nebo derivátu plasminogenu, jako je lys-plasminogen.

Tento vynález bude v další části spisu popsán pomocí následujících obrázků.

Obrázek 1 ukazuje eluční profil lys-plasminogenu z S-sepharosy elucí 0,5M NaCl.

Obrázek 2 ukazuje eluční profil lys-plasminogenu z S-sepharosy elucí 3mM 6-AHA.

Obrázek 3 ukazuje ne-redukující SDS-PAGE eluovaných frakcí při eluci lys-plasminogenu působením 0,5M NaCl a 3mM 6-AHA.

Obrázek 4 ukazuje eluční profil z afinitní kolony (lysin-sepharosa) dialysovaného eluátu při eluci lys-plasminogenu elucí 0,5M NaCl.

Obrázek 5 ukazuje eluční profil z afinitní kolony (lysin-sepharosa) dialysovaného eluátu při eluci lys-plasminogenu elucí 3mM 6-AHA.

Obrázek 6 ukazuje ne-redukující SDS-PAGE různých eluovaných frakcí z eluce na kolonách s lysin-sepharosou uvedených na obrázku 4 a 5.

Obrázek 7 ukazuje výsledek analýzy plasminu lys-plasminogenu dále čištěného na koloně s lysin-sepharosou.

Před uvedením vynálezu by mohlo být pro porozumění užitečné uvést definice některých níže zde používaných pojmů.

Pojem "plasminogen" obvykle znamená lidský glu-plasminogen.

Pojem "deriváty plasminogenu" zahrnuje různě degradované nebo mutované formy plasminogenu včetně lys-plasminogenu, které

si zachovávají alespoň jednu z pěti kringlových domén, s výhodou více než tři a nejvýhodněji všech pět kringlových domén. Mutace zahrnuje náhradu jednoho nebo více zbytků aminokyselin z přírodní molekule nebo delecí či přidání aminokyselinového zbytku za účelem modifikace vlastností molekuly žádoucím způsobem.

Pojem " ω -aminokyseliny" znamená aminokyseliny s volnou aminokyselinou navázanou na nejvzdálenější atom uhlíku vzhledem ke karboxylové skupině.

Pojem "proteiny, které obsahují kringl", znamená takové proteiny, které obsahují jednu nebo více tak zvaných kringlových struktur známých například u t-PA a plasminogenu.

Pojem "selektivní eluce" znamená eluci žádaného proteinu s nedetegovatelnými množstvími nežádoucích proteinů.

Pojem "roztok proteinů" znamená biologický roztok nebo vodný roztok, který obsahuje četné proteiny včetně žádaného proteinu.

Pojem "biologické roztoky" znamená plasmu, serum nebo jejich frakce nebo roztoky získané extrakcí orgánů lidského nebo zvířecích původu.

Pojem "v podstatě konstantní pH" bude znamenat proměny v rozmezí ± 1 jednotky pH, s výhodou $\pm 0,5$ jednotky pH ve srovnání s pH v pufru před přidáním ω -aminokyseliny.

Pojem "v podstatě konstantní iontová síla" bude znamenat, že iontová síla se může měnit v rozmezí ± 20 %, s výhodou ± 10 % iontové síly v pufru před přidáním ω -aminokyseliny.

I když způsob čištění zde uvedený se může používat pro čištění proteinů obsahujících kringl z biologických roztoků, jako je plasma a serum, může se s výhodou používat pro čištění

těchto proteinů z kultivačního media nebo roztoku získaného rozbitím buněk, které intracelulárně produkují protein. Buňkami, které produkují protein obsahující kringl, mohou být přírodní buňky nebo transformované nebo transfektované buněčné linie, které jsou schopny exprimovat vloženou DNA sekvenci kodující protein obsahující kringl.

Iontoměničová kolona je dobře známa odborníkům. Mezi vhodné iontoměničové kolony patří S-sepharosa (S-Sepharose^(R)) a Fractogel SO₃.

ω -Aminokyselinami jsou s výhodou aminokyseliny s alespoň 4 atomy uhlíku v uhlíkatém řetězci mezi karboxylovou skupinou a ω -aminoskupinou. Uhlíkatý řetězec může být lineární nebo cyklický. Příklady vhodných lineárních ω -aminokyselin jsou 4-aminomáselná kyselina, 5-aminopentanová kyselina, 6-aminohexanová kyselina (ϵ -aminokapronová kyselina (6-AHA)), 7-aminoheptanová kyselina, 8-aminooktanová kyselina, lysin a arginin. Mezi příklady cyklických ω -aminokyselin patří trans 4-aminomethylcyklohexankarboxylová kyselina (tranexamová kyselina) a para-aminomethylbenzoová kyselina.

Způsob podle tohoto vynálezu může být v principu použit pro čištění jakéhokoliv proteinu obsahujícího kringl, který se váže na ω -aminokyselinu a který je schopen být eluován z iontoměničové kolony bez jakékoliv podstatné změny pH a/nebo iontové síly během eluce. Velkým přínosem je to, že nečistoty ve formě jiných proteinů vázaných na kolonu spolu se žádaným proteinem zůstanou na koloně, protože pH nebo iontová síla se podstatným způsobem nemění. Selektivní eluční efekt ω -aminokyselin může vést k tomu, že jejich navázání na protein obsahující kringl, je tak silné, že může změnit pI proteinu nebo může způsobit některé konformační změny molekuly, což způsobí uvolnění z materiálu kolony.

Důležitou skupinou proteinů, které lze čistit způsoby podle tohoto vynálezu, jsou proteiny obsahující tak zvaný kringl

[viz například L. Patthy, Blood Coagulation and Fibrinolysis 1, 153 (1990).]. Tyto proteiny mohou obsahovat jednu nebo více kringlových struktur, z nichž mnohé se vážou na lysin nebo analogy lysinu, jako je trans-4-aminomethylcyklohexankarboxylová kyselina a ϵ -aminokapronová kyselina. Mezi příklady proteinů obsahujících takové kringlové struktury patří t-PA a analogy t-PA s různými modifikacemi růstového faktoru a kringlových domén a okolní aktivační místa, jak je to popsáno v publikovaných evropských patentových přihláškách 191 843, 201 153, 207 589, 241 209, 233 013, 240 334, 293 936, 293 934 a 292 009. Dalšími příklady jsou plasminogen, lys-plasminogen, apo-lipoprotein a, hepatocytový růstový faktor, FXII, protrombin, uPA a nově objevený protein s předpokládanými vlastnostmi potlačovatele nádorů [Degen S.J.F.: abstrakt konference "20th Lindeström Lang Conference", Vingstedt, Dánsko, 164 (1991).].

I když je tento způsob primárně zamýšlen pro použití v počátečních stupních čištění, kde je počet nečistot velký, může se používat také v pozdějších nebo v konečných čistících stupních, kde již některé nebo většina nečistot je odstraněna předcházejícím čištěním chromatografií na koloně s ionexem nebo afinitním nosičem nebo jinými vhodnými způsoby.

Eluát z kolony s iontoměničem se s výhodou dále čistí dalšími vhodnými čistícími stupni, jako je dialýza, gelová filtrace a afinitní chromatografie.

Tento vynález bude objasněn dále podrobněji s ohledem na čištění plasminogenu.

Lidský plasminogen je jednovláknový glykoprotein s molekulovou hmotností asi 90 000. Obíhá v plasmě v asi 2 μ M koncentraci. Z lidské plasmy může být vyčištěn afinitní chromatografií na lysinu navázaném na sepharosu (Sephacrose[®]). Přírodní forma plasminogenu má na aminovém konci kyselinu glutamovou a nazývá se "glu-plasminogen". Molekula plasminogenu sestává ze 791 aminokyseliny s 24 disulfidovými můstky, 5 trojsmyčkovými "krin-

glovými" oblastmi a doménou serinové proteinasy.

Jako důsledek proteolytického štěpení přírodní molekuly bylo získáno několik nízkomolekulárních forem lidského plasminogenu. Nomenklatura, která se pro tyto molekuly používá, je založena na poloze aminokyseliny počítáno od aminového konce v sekvenci. Vystavení glu-plasminogenu účinku plasminu po velice krátkou dobu vede k odštěpení 77 zbytků na aminovém konci glu-plasminogenu za vzniku molekuly plasminogenu, lys-plasminogenu s molekulovou hmotností přibližně 83 000, který má obrovský význam pro některé vlastnosti fibrinolytického systému.

Konverse plasminogenu na aktivní proteinasu, plasmin, je katalyzována tak zvanými aktivátory plasminogenu, plasminogenovými aktivátory (PAs). Plasmin je považován za primární fibrinolytický enzym v oběhu vyšších obratlovců, ale může hrát také důležitou roli při jiných mimovaskulárních proteolytických událostech.

Plasminogen a lys-plasminogen se mohou používat jako trombolytické činidlo [viz K. Anderle a spol.: *Haemostatis* 18, 165 (1988).].

Lidský plasminogen se může z plasmy vyčistit několika způsoby. Všechny dosud známé způsoby čištění z lidské plasmy jsou založeny na afinitní chromatografii, jak to popisují D.G. Deutsch a E.T.Mertz: *Fed. Proc.* 29, 647 (1979) a *Science* 170, 1095 (1970). Afinitní matrice (lysin-Sepharose^(R)) se připraví kovalentním navázáním α -aminoskupiny L-lysinu na sepharosu. Kolonou s lysin-sepharosou ekvilibrovanou fosforečnanovým pufrem (pH 7,4) se pak nechá za teploty místnosti procházet plasma zředěná vodou, při čemž kolona se promývá fosforečnanovým pufrem. Plasminogen se pak eluuje 0,2M ϵ -aminokapronovou kyselinou (pH 7,4). ϵ -Aminokapronová kyselina se odstraní od plasminogenu za studena gelovou filtrací na sephadexu ekvilibrovaném fosforečnanovým pufrem.

Aplikace lidských proteinů vyčištěných z plasmy vždy v sobě zahrnuje jisté riziko virové infekce. V případě lidských proteinů odvozených od plasmy se to týká zvláště rizika infekcí HIV a hepatitidou.

Aby bylo možné se tomuto riziku vyhnout, bylo by výhodné produkovat plasminogen technologií rekombinace DNA. Pokusy vyrábět plasminogen v transfektovaných buňkách však ukázaly, že aktivace intracelulárního plasminogenu a následná degradace jsou překážkou pro výrobu neporušeného rekombinantního plasminogenu v přijatelných výtěžcích. Tento problém byl vyřešen koexpresí plasminogenu spolu s inhibitorem proteinasy, který je schopen inhibovat aktivaci plasminogenu, viz evropská publikovaná patentová přihláška č. 319 944.

Lys-plasminogen nebo glu-plasminogen se mohou tedy vyrábět koexpresí lys- nebo glu-plasminogenu a α -2-plasminového inhibitoru, α_2 -PI, v buňkách BHK. Glu-plasminogen nebo lys-plasminogen se mohou koexprimovat také s α -1-antitrypsinem (AAT) v transfektovaných BHK buňkách nebo jejich derivátech. Koexprese s AAT zajišťuje, že urokinasa produkovaná BHK buňkami je inhibována AAT. Aktivace plasminogenu urokinasou a plasminem zprostředkované proteolytické štěpení se tak sníží a dosáhne se vysokých hladin neporušeného plasminogenu. Plasminogen se z kultivačního media vyčistí dvoustupňovým postupem zahrnujícím stupeň chromatografie na ionexu následovaný stupněm afinitní chromatografie na lysin-sepharose. Podrobněji řečeno, kolona s ionexem (S-sepharosa) se promyje a potom se eluuje 0,5M NaCl. Eluát se nechá projít afinitní chromatografickou kolonou (lysin-sepharosa) a plasminogen se izoluje elucí 6-AHA.

Jak bylo shora uvedeno, transfektované BHK buňky budou expresí vedle plasminogenu poskytovat urokinasu. pI plasminogenu a urokinasy je 6,7 až 8,1 a 8,5. Z toho plyne, že jak plasminogen tak urokinasa jsou navázány na kolonu s ionexem, zatímco koexpresí produkovaný inhibitor plasminogenového aktivátoru se objevuje v prázdném objemu.

I když se tímto způsobem získají vysoké výtěžky plasminogenu, bylo zjištěno, že během stupně afinitní chromatografie může v jistém rozsahu dojít k aktivaci plasminogenu. To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že inhibitor plasminogenního aktivátoru se odstraní v předcházejícím stupni čištění na koloně ionexu. Jestliže se plasminogen a aktivátor plasminogenu eluují společně z kolony s ionexem (S-sepharosou), dokonce malá množství aktivátoru plasminogenu (urokinasy) v eluátu mohou způsobit aktivaci plasminogenu na plasmin. Výsledkem pak je to, že plasminogenní produkt obsahuje malé množství plasminu.

Použití 6-AHA v prvním stupni čištění s ionexem překvapivě vedlo k tomu, že se selektivně eluuje lys-plasminogen bez současné eluce urokinasy. Tím se lze vyhnout nezamýšlené aktivaci plasminogenu na plasmin v eluátu urokinasou. Získá se tak čistší produkt ve srovnání s elucí způsobem solného gradientu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Čištění lys-plasminogenu

Lys-plasminogen se vyrábí postupem, který je analogický k postupu popsanému v evropské patentové přihlášce č. 319 944.

Urokinasa (uk) vylučovaná buňkami BHK se inhibuje α -1-antitrypsinem, který se získává koexpresí spolu s plasminogenem. Přítomnost aktivátoru by mohla být demonstrována exponenciálním vývojem produktu při chromatogenní analýze plasminu. Přítomnost uk v kultivačním mediu byla prokázána "technikou přelití fibrinu" [Graneli-Piperno a Reich: J. Exp. Med. 148, 233 (1978).].

Vzorek kultivačního media se rozdělí na dvě stejné frakce. Proveďte se srovnání eluce z kolony s iontoměničem, S-sepharosou, v prvním stupni buď puforem 6-AHA nebo 0,5M NaCl. Každý e-

luát se dále dialyzuje a vyčistí na lysin-sepharose.

Pokus 1

S-sepharosa, eluce NaCl (test č. 910723)

Ekvilibrační pufr: 0,02M NaH_2PO_4 , 0,04M NaCl, 0,02 % Tweenu 80,
3 mg/l aprotininu, pH 5,0,
promývací pufr 1: ekvilibrační pufr,
promývací pufr 2: ekvilibrační pufr s 0,15M NaCl, pH 5,5,
eluční pufr 3: ekvilibrační pufr s 0,50M NaCl a bez aprotininu,
pH 5,5.

Ke každé frakci se přidá aprotinin po tom, co byl ve vzor-
ku stanoven plasmin. Na kolonu (5 ml) se přivede 750 ml kulti-
vačního media s průtokem 125 ml/h. Eluční profil je uveden na
obrázku 1. Eluční profil je poněkud strmý. Lys-plasminogen se
nachází v druhém maximu.

Na obrázku 1 čísla pod základní čarou (1, 2 a 3) ukazují,
kdy se přidávají různé pufrы (1. ekvilibrační pufr, 2. promýva-
cí pufr (0,15M NaCl, pH 5,5) a 3. eluční pufr (0,5M NaCl, pH
5,5). Čísla nad základní čarou (22,...30) jsou čísla frakcí po-
užitých v SDS PAGE (obrázek 3).

Pokus 2

S-sepharosa, eluce 6-AHA (test č. 910724)

Provede se stejný pokus jako shora uvedeno až na to, že
se kolona eluuje ve dvou stupních: První eluce se provádí eluč-
ním pufrem, který obsahuje 0,02M NaH_2PO_4 , 0,18M NaCl, 0,02 %
Tweenu 80 a 3mM 6-AHA, pH 5,0. Druhá eluce se provede jako v
pokusu 1.

Eluční profil je uveden na obrázku 2. Lys-plasminogen se
nachází v druhém maximu. Třetí maximum představuje různé nečis-

toty.

Na obrázku 2 čísla pod základní čarou (1, 2, 3 a 4) ukazují, kdy se přidávají různé pufrы (1. ekvilibrační pufr, 2. promývací pufr (0,5M NaCl, pH 5,5), 3. eluční pufr I (0,18M NaCl, 3mM 6-AHA, pH 5,5) a 4. eluční pufr II (0,5M NaCl, pH 5,5). Čísla nad základní čarou (16 až 42) jsou čísla frakcí použitých v SDS PAGE (obrázek 3).

Obrázek 3 ukazuje neredukovanou SDS-PAGE frakcí z eluce z obou pokusů. Spolu s aprotininem se eluuje velmi mnoho vysokomolekulárních komplexů.

Čísla pásů znamenají následující:

1. standard molekulové hmotnosti
2. plasmový lys-plasminogen (kontrola)
3. kultivační medium použité v testu 910723
4. frakce č. 23 na obr. 1
5. frakce č. 24 na obr. 1
6. frakce č. 25 na obr. 1
7. frakce č. 26 na obr. 1
- (pokus 1)
8. kultivační medium použité v testu 910724
9. frakce č. 16 na obr. 2
10. frakce č. 22 na obr. 2
11. frakce č. 23 na obr. 2
12. frakce č. 26 na obr. 2
13. frakce č. 30 na obr. 2
14. frakce č. 42 na obr. 2
15. standard molekulové hmotnosti
- (pokus 2)

Je vidět, že eluce 3mM 6-AHA (pásy 10 až 13) vedou k čistému produktu (lys-plasminogen), který neobsahuje komplexy s vysokými molekulovými hmotnostmi, zatímco eluce NaCl (pásy 4 až 7) vedou k produktu znečištěnému některými nečistotami s vysokými molekulovými hmotnostmi.

Pro zjištění toho, jestli izolovaný lys-plasminogen obsahuje menší množství plasminu (díky aktivaci urokinasou v eluátu z kolony s ionexem), bylo provedeno další čištění lysin-sepharose. Tímto čištěním se mimo jiné odstraní aprotinin.

Oba eluáty se dialyzují proti níže uvedenému ekvilibračnímu pufru a vyčistí se afinitní chromatografií na lysin-sepharose:

velikost kolony: 5 ml, průtok: 50 ml/h,
ekvilibrační pufr: 0,1M Na_2HPO_4 , 0,02 % Tweenu 80, 3 mg/l apr.,
pH 7,4,
promývací pufr 1: ekvilibrační pufr,
promývací pufr 2: ekvilibrační pufr s 0,15M NaCl, ale bez aprotininu.

Eluce se provádí gradientem 0,1M Na_2HPO_4 obsahujícím 0,02 % Tweenu 80 a od 0 do 5 mM 6-AHA, 50 ml každého. Obrázek 4 ukazuje eluční profil dialyzovaného eluátu z pokusu 12 (NaCl).

Čísla pod základní čarou (1, 2, 3 a 4) se týkají následujících stupňů:

1. aplikace vzorku
2. promývací pufr 1,
3. promývací pufr 2 a
4. počátek elučního gradientu.

Čísla nad horní čarou (8, 10, 12) označují čísla frakcí použitých v SDS-PAGE (obrázek 6).

Obrázek 5 ukazuje eluční profil dialyzovaného eluátu z pokusu 2 (6-AHA).

Čísla pod základní čarou (1, 2, 3 a 4) se týkají následujících stupňů:

1. aplikace vzorku
2. promývací pufr 1,
3. promývací pufr 2 a

4. počátek elučního gradientu.

V některých případech je na obrázku vidět sedlo. Z literatury je známo, že dvě glykosylační formy plasminogenu mají různou afinitu k lysin-sepharose.

Obrázek 6, který je SDS-PAGE elučních frakcí z kolony s lysin-sepharosou, ukazuje, že lys-plasminogen je dost čistý produkt, jestliže se vezme v úvahu to, že prošel pouze dvěma stupni čištění.

Čísla pásů znamenají následující:

1. standard molekulové hmotnosti
2. plasmový lys-plasminogen
3. vzorek aplikovaný na obr. 4 (z testu č. 910723 bez 6-AHA, obr. 1),
4. = 3,
5. frakce č. 7 na obr. 4
6. frakce č. 9 na obr. 4
7. frakce č. 11 na obr. 4
8. vzorek aplikovaný na obr. 5 (z testu č. 910724 s 6-AHA, obr. 2)
9. = 8
10. frakce č. 7 na obr. 5
11. frakce č. 8 na obr. 5
12. frakce č. 9 na obr. 5
13. frakce č. 10 na obr. 5
14. standard molekulové hmotnosti

Obrázek 7 ukazuje výsledky analýzy plasminu vyčištěného lys-plasminogenu, který byl vyčištěn podle vynálezu (A), tj. elucí 6-AHA ve stupni čištění na S-sepharose a elucí NaCl (B). Analýzy byly prováděny pomocí chromogenního substrátu S2251. Test standardním postupem, kde p-NA neobsahuje S 2251^(R) (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), enzymatickým působením plasminu, při němž se vyvíjí žlutá barva měřená při 405 nm. Před testem se všechny

vzorky zředí tak, aby měly stejnou koncentraci proteinu. Je zřetelně vidět, že plasmin není detegovatelný v produktu, který byl eluován z S-sepharosy 6-AHA (neobjevila se žádná barva). Jestliže se eluce provádí NaCl, produkt obsahuje plasmin, což ukazuje na to, že v eluátu došlo k jisté aktivaci lys-plasminogenu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl, který je schopen vázat se na ω -aminokyseliny z roztoku proteinů, který obsahuje takový protein obsahující kringl, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje následující stupně:
 - a) roztok proteinů obsahující kringl se nanese na ionexovou kolonu za takových podmínek, aby se protein obsahující kringl navázal na materiál kolony,
 - b) protein obsahující kringl se eluuje působením ω -aminokyseliny bez toho, aby se podstatným způsobem změnilo pH a iontová síla a
 - c) protein obsahující kringl se izoluje z eluátu ze stupně b) dalšími vhodnými čistícími stupni.
2. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že ω -aminokyselina je vybrána ze skupiny sestávající ze 4-aminomáselné kyseliny, 5-aminopentanové kyseliny, 6-aminohexanové kyseliny, 7-aminopentanové kyseliny, 8-aminooktanové kyseliny, lysinu, argininu a terc.aminomethylcyklohexan-1-karboxylové kyseliny.
3. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinem obsahujícím kringl je t-PA nebo analog t-PA.
4. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinem je plasminogen nebo derivát plasminogenu.
5. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že derivátem plasminogenu je lys-plasminogen.
6. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl podle kterého-

koliv z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se jako ω -aminokyselina používá 6-aminohexanová
kyselina (6-AHA).

7. Způsob čištění proteinu obsahujícího kringl podle kterého-
koliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e
t í m, že se eluát ze stupně ad b) podrobí afinitní chro-
matografii.

Zastupuje:

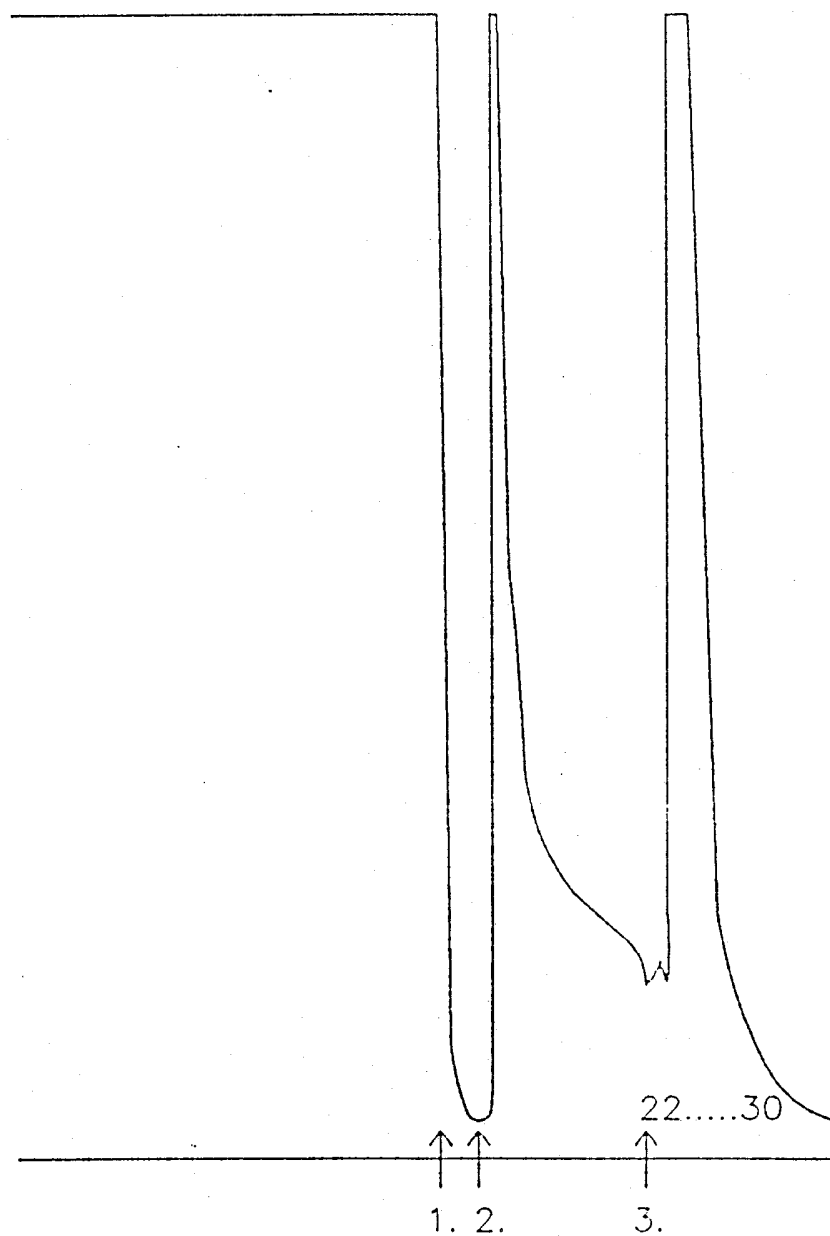
L. J. JENSEN
CHEMICAL ANALYSIS
DIV.

86 01

0000

451107

10



S-sepharosa

Obr. 1

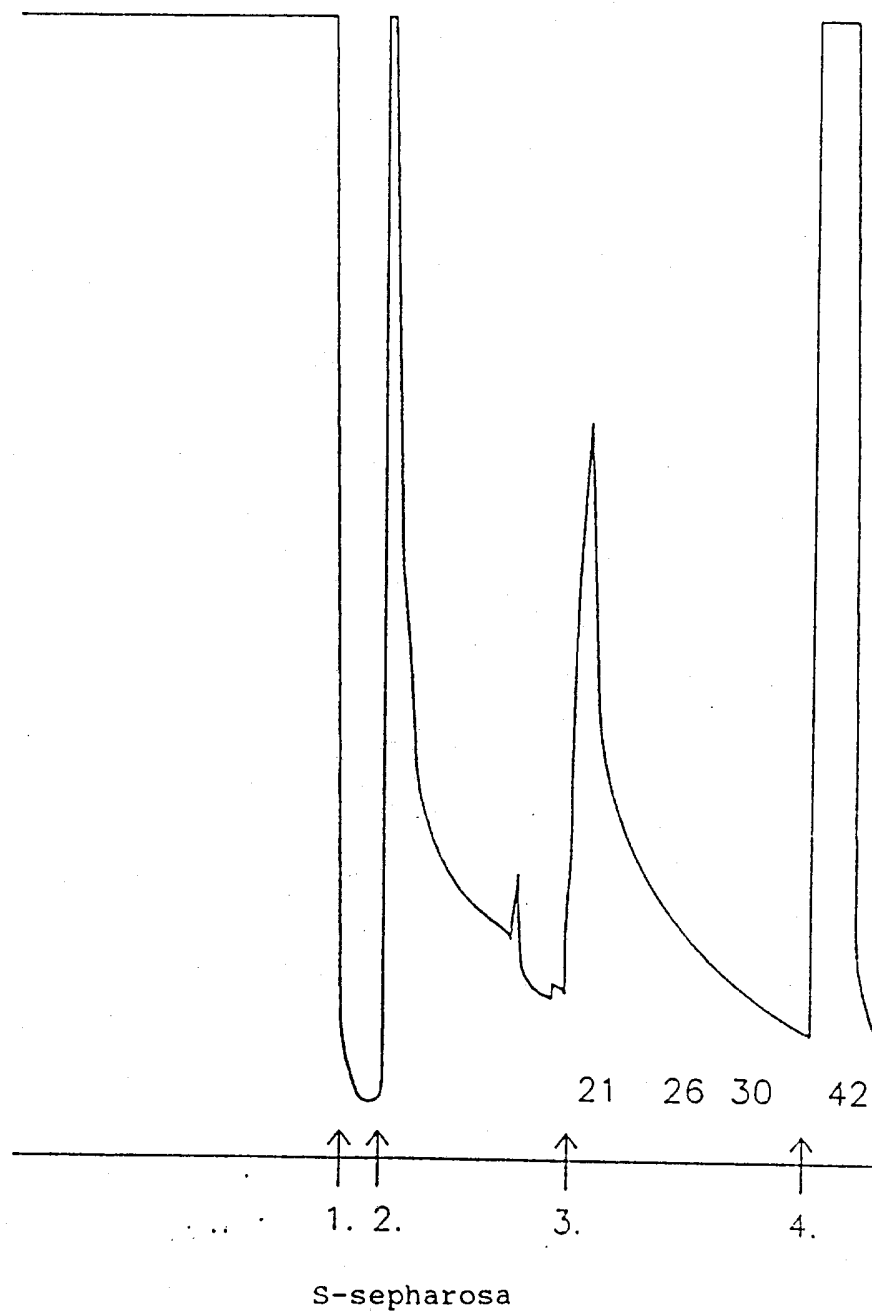
1000000
1000000
1000000

1000000

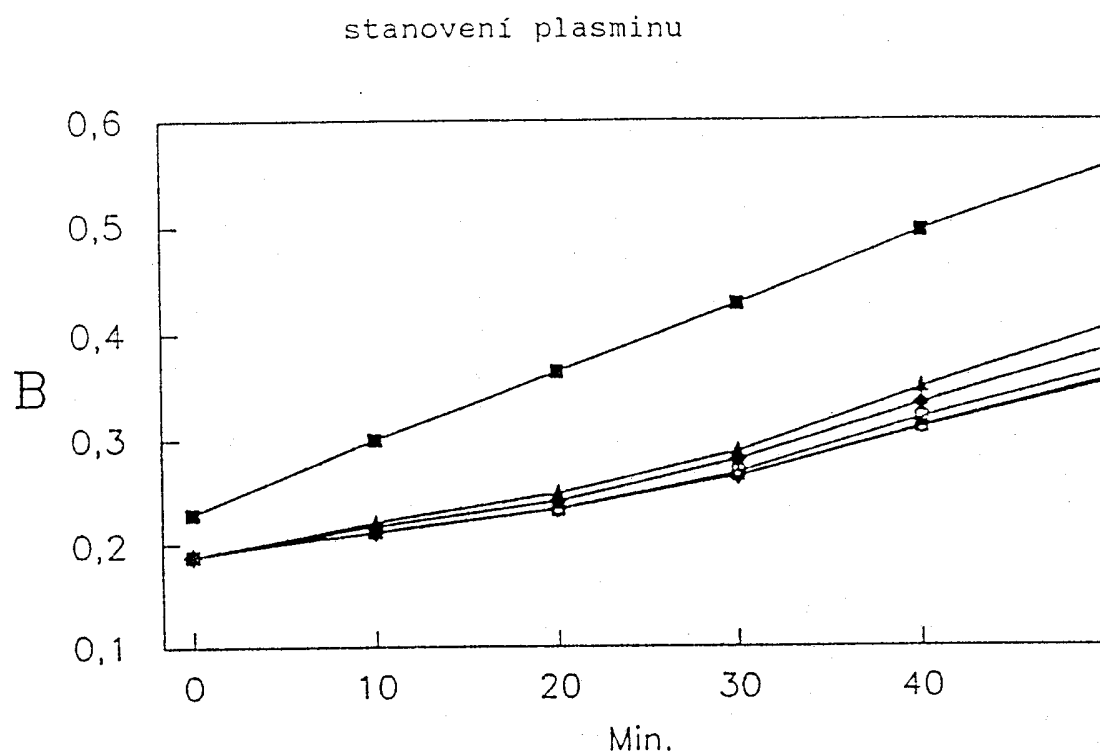
1000000

1000000

1000000



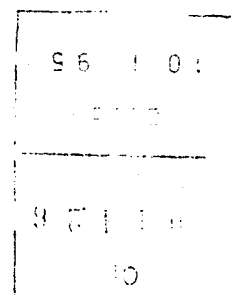
Obr. 2

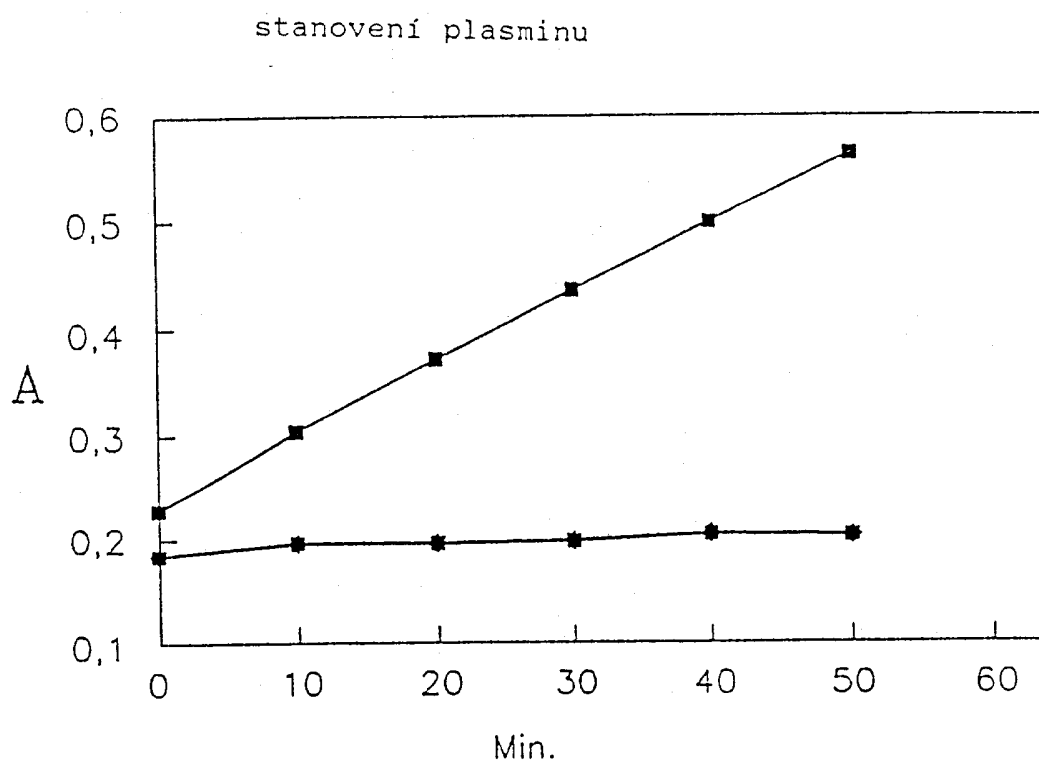


eluze NaCl

- lidský plasminogen
- ◆— frakce 5
- ▲— frakce 7
- frakce 9
- ◇— frakce 11
- △— frakce 13

Obr. 7 (pokračování)

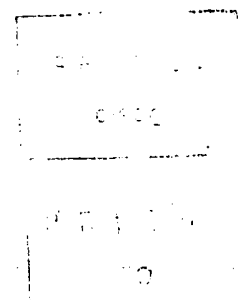


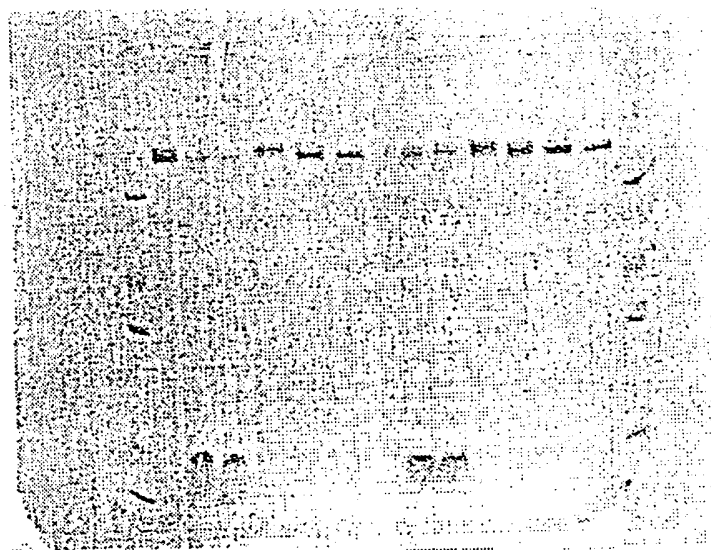


eluce 6-AHA

- lidský plasminogen
- ◆— frakce 5
- ▲— frakce 7
- frakce 8
- ◇— frakce 9
- △— frakce 12

Obr. 7





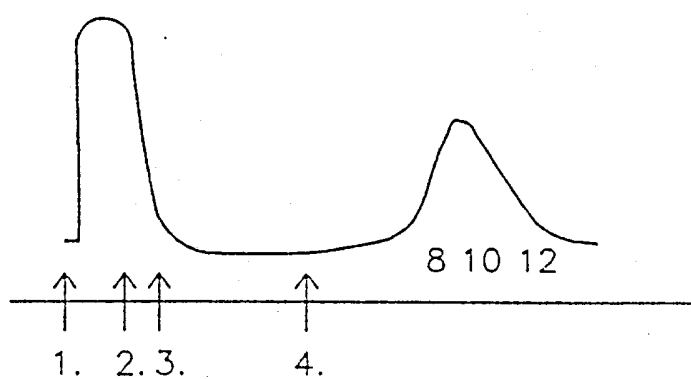
1,2,3,4,5,6,7, 8,9,10,11,12,13,14

SDS-PAGE
10% gel,
neredukované vzorky

Obr. 6

0.500
0.500
0.500

0.500

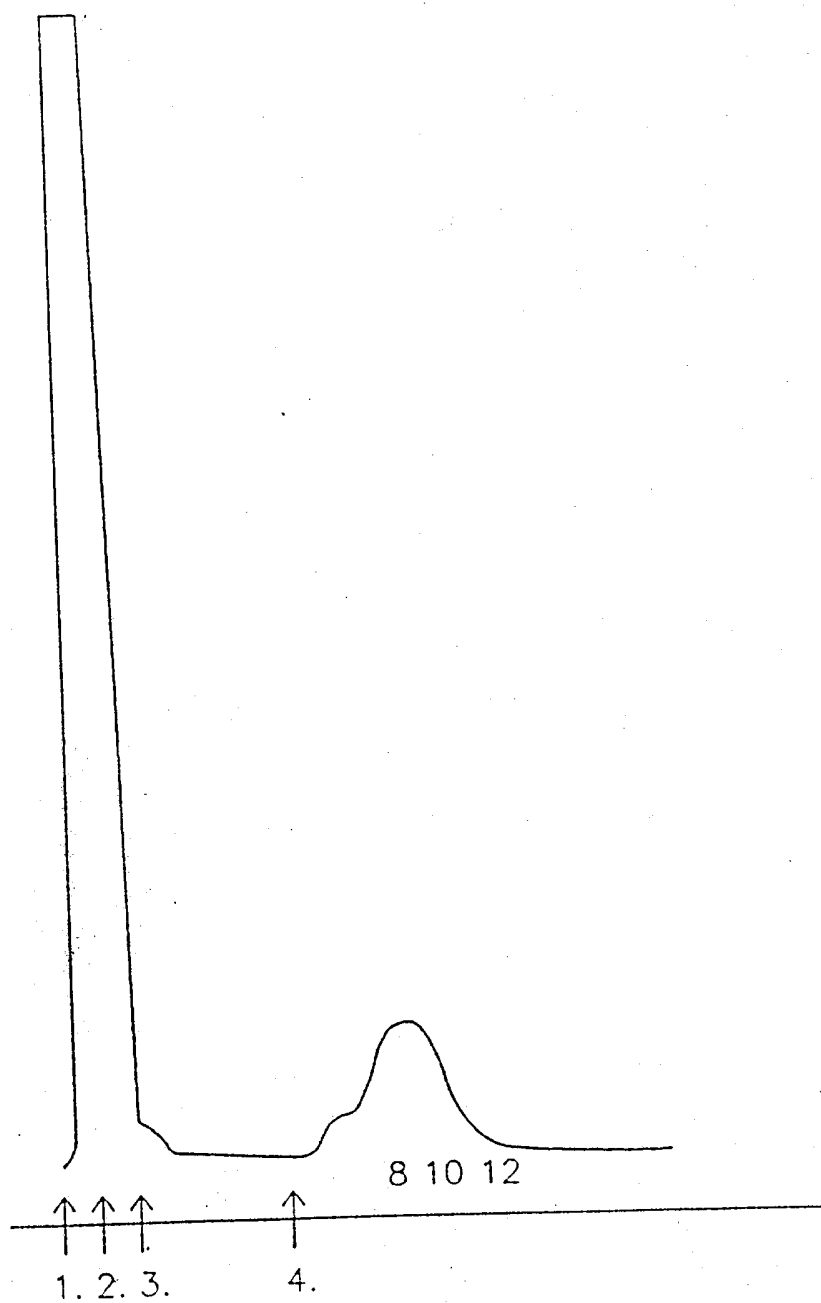


lysin-sepharosa FF

Obr. 5

RECEIVED
DIRECTORATE
OCT 10

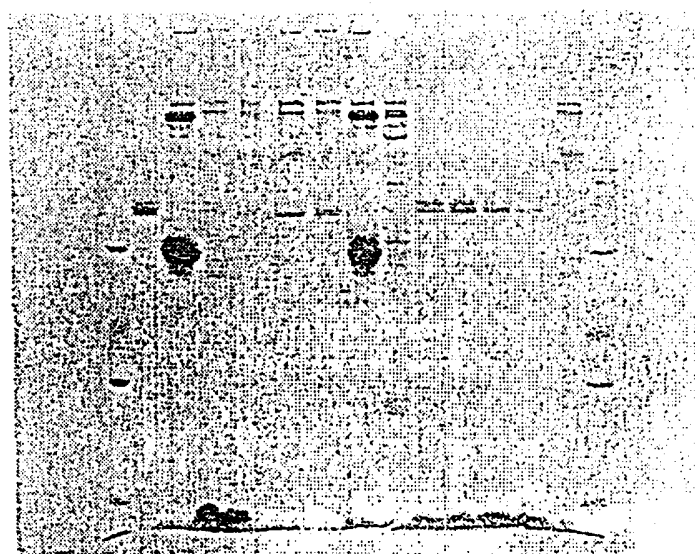
38	1	01
1976		
OCT 10		
10		



lysin-sepharosa FF

Obr. 4

01	0111211	Dosio	10185
----	---------	-------	-------



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

SDS-PAGE, 10% gel
neredukované vzorky

Obr. 3