

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

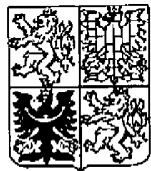
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3256-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09. 04. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.04.95, 07.06.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/95200945, 95/475260**

(33) Země priority: **EP, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**

(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/01509**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/32413**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/505

(71) Přihlašovatel:

GRUPPO LEPETIT S. P. A., Lainate, IT;

(72) Původce:

Zanette Dino, Pianzano, IT;

Sarubbi Edoardo Giacomo,

Fontenay-Sous-Bois, FR;

Soffientini Adolfo, Sesto San Giovanni, IT;

Restelli Ermenegildo, Gerenzano, IT;

Grigoletto Armando, Mortara, IT;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob čištění erythropoetinu

(57) Anotace:

Způsob čištění erythropoetinu z biologických tekutin spočívá v tom, že se k izolaci erythropoetinu užije chromatografická matrice, s výhodou obsahující fenyloboritanové skupiny, po tomto chromatografickém stupni, který však může být zařazen i na jiné místo postupu se eluát zpracovává chromatografií na aniontoměničové matrici s kvarterními amoniiovými funkčními skupinami. Tímto způsobem je možno získat produkt v dobrém výtěžku s vysokou čistotou, postup je vhodný k provádění ve velkém měřítku.

CZ 3256-97 A3

Způsob čištění erythropoetinu

Oblast techniky

Vynález se týká jednoduchého a účinného způsobu pro izolaci biologicky účinných glykoproteinů, například erythropoetinu z biologických tekutin, které tyto látky obsahují.

Dosavadní stav techniky

Příprava erythropoetinu z různých zdrojů včetně buněk, které byly získány genetickým inženýrstvím byla popsána v různých evropských patentových spisech, například EP 148 605, EP 205 564, EP 209 539, EP 267 678, EP 649 464 a EP 672 160.

Pod pojmem "erythropoetin" se v průběhu přihlášky rozumí přírodně se vyskytující erythropoetin, který je možno získat například z lidské moči nebo polypeptidu, jejichž řetězec aminokyselin včetně glykosylace je zdvojen ve srovnání s přírodně se vyskytujícím erythropoetinem. Uvedené látky podporují in vivo buňky kostní dřeně ke zvýšené produkci retikulocytů a červených krvinek. Zahrnut je také erythropoetin, který je možno získat z kultury savčích buněk tak, že se do těchto buněk uloží neporušený gen pro erythropoetin nebo erythropoetin, který je možno získat z kultury savčích buněk aktivací endogenního genu nebo genů pro erythropoetin, tak jak bylo popsáno například v mezinárodní patentové přihlášce, zveřejněné pod číslem WO 93/09222 (podána jako PCT/US 92/09627, nebo v mezinárodní patentové přihlášce, zveřejněné pod číslem WO 94/12650 s prioritou z US přihlášky č. 07/985 586.

Způsob podle vynálezu je zvláště vhodný pro izolaci erythropoetinu ze živného prostředí, v němž jsou pěstovány kultury buněk, produkujících erythropoetin.

Pod pojmem "živné prostředí" se rozumí jakákoliv kapalina, získaná syntetickým způsobem, například živné prostředí pro pěstování savčích buněk, zvláště takových, které byly podrobeny genetické transformaci.

Živné prostředí se v tomto případě oddělí od vypěstovaných buněk a buněčné drti filtrací nebo ultrafiltrací obvyklým způsobem. Z tohoto důvodu znamená "zfiltrované živné prostředí" prostředí, oddělené od buněk a buněčné drti filtrací nebo ultrafiltrací.

"Produkční buňky" jsou s výhodou stabilizované nebo nestabilizované buněčné linie eukaryotického původu nebo s výhodou buněčné linie savců, které jsou při pěstování ve vhodném prostředí schopné produkovat požadovaný glykoprotein v izolovatelném množství. Jako příklady takových buněk je možno uvést fibroblasty, keratinocyty, epitheliální buňky, například z mléčné žlázy nebo ze střev, endotheliální buňky, buňky glie, nervové buňky, krevní buňky, například lymfocyty nebo buňky kostní dřeně, svalové buňky a mimoto také prekurzory všech těchto somatických buněčných typů. Jak již bylo uvedeno, jde s výhodou o buněčný materiál savčího původu, například může jít o myši, krysy, králíky, kočky, psy, vepře, skot, ptáky, ovce, kozy, koně, opice nebo člověka. Nejvýhodnější je materiál z primátů a člověka. Pod pojmem "produkční buňky" se rozumí také primární, sekundární nebo imortalizované buňky obratlovců, zvláště savců, nejvýhodněji primátů nebo člověka po transfekci exogenním genetickým materiálem, který přímo nebo nepřímo u buněk vyvolává produkci izolovatelného množství erythropoetinu, tak jak bylo popsáno v mezinárodních patentových přihláškách č. WO 93/09222 nebo WO 94/12650.

Příklady imortalizovaných lidských buněčných linií, které je možno použít k produkci erythropoetinu jsou obecně

známé a dostupné. Jde například o HeLa buňky a jejich deriváty, například ATCC CCL 2, 2.1 a 2.2, o buňky karcinomu mléčné žlázy MCF-7, například ATCC HTB 22, o leukemické buňky K-562, například ATCC CCL 234, buňky karcinomu KB, například ATCC CCL 17, buňky karcinomu vaječníku 2780AD, popsané v publikaci Van del Blick A. M. a další, Cancer Res., 48, 5927 až 5932, 1988, buňky Raji, ATCC CCL 86, buňky Jurkat, ATCC TIB 152, buňky Namalwa, ATCC CRL 1432, buňky HL-60, ATCC CCL 240, buňky WiDr, ATCC CCL 218, buňky HT1080, ATCC CCL 1219, buňky Daudi, ATCC CCL 213, buňky RPMI 8226, ATCC CCL 155, buňky U-937, ATCC CRL 1593, buňky Bowesova melanomu, ATCC CRL 9607, podlinie WI-38VA13 buněk 2RS, ATCC CCL 75.1 a buňky MOLT-4, ATCC CRL 1582. Je také možno použít sekundární kmeny lidských fibroblastů, například WI-38, ATCC CCL 75 a MRC-5, ATCC CCL 171.

Jak již bylo uvedeno, způsobem podle vynálezu je možno izolovat požadované glykoproteiny z jakéhokoli živného prostředí uvedených kultur.

Široká aplikace technologií genetického inženýrství pro přípravu biologicky aktivních bílkovin ve velkém měřítku podstatně zvýšila vyhlídky získat tyto látky v množství, které odpovídá poptávce. V některých případech je však izolace těchto látek z živného prostředí obtížná, pracná a nákladná. Jde zvláště o případy, kdy bílkovina je vysoce glykosylována, jak již bylo svrchu uvedeno. V těchto oblastech stále přetrvává potřeba jednoduchých a účinných izolačních postupů, které by byly použitelné pro výrobu uvedených látek ve velkém měřítku.

V případě, že se v průběhu přihlášky uvádí specifická účinnost erythropoetinu, jde o účinnost, stanovenou metodou ELISA, například pomocí zkušebního balíčku pro stanovení lidského erythropoetinu (R and D systems, Inc.).

Obsah bílkovin ve vzorku se měří zkouškou BCA na bílkoviny.

~~Tyto zkoušky budou dále uvedeny podrobněji v odstavcích, tý-~~
kajících se analytických postupů.

Vynález si klade za úkol navrhnout izolační postupy, zvláště vhodný chromatografický postup, který by využíval jednoduchých materiálů, například matrice s dihydroxyboronylovými skupinami. Tento chromatografický stupeň je účinný a snadno proveditelný a je tedy možno jej zařadit jako první nebo některý následující stupeň vícestupňového postupu. V případě zařazení jako první stupeň se tato chromatografie s výhodou kombinuje s chromatografií na iontoměniči jak bude dále podrobněji popsáno. Uvedený vícestupňový postup může zahrnovat mimoto jakýkoliv počet dalších chromatografických stupňů, při nichž je možno použít chromatografií na iontoměniči, chromatografií s oddělením izolovaných látek podle molekulové hmotnosti, hydrofobní interakci a afinitní chromatografické postupy.

V případě, že se dihydroxyboronylová chromatografie provádí jako některý z mezistupňů vícestupňového postupu, provádí se tento postup s výhodou tak, že se částečně čištěný materiál, který obsahuje erythropoetin nanese na chromatografickou matrici, kterou je matrice s dihydroxyboronylovými skupinami. Částečně čištěný materiál se rovněž uvede do rovnovážného stavu v tomtéž pufru jako matrice před nanesením na tuto matrici. Tento pufťr bude dále označován jako "první ekvilibrační pufťr" a bude podrobněji popsán. Tento postup je pro čištění erythropoetinu zvláště vhodný.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob čištění erythropoetinu, který spočívá v tom, že se

- a) zfiltrované živné prostředí s obsahem glykoproteinu, který má být izolován, uvede do styku s chromatografickou maticí s dihydroxyboronylovým materiálem, předem uvedenou do rovnovážného stavu,
- b) matrice se promyje prvním elučním pufrém a tento eluát se přímo uvede do styku s aniontoměničovou maticí s kvartěrními amoniiovými funkčními skupinami a
- c) glykoprotein se vymývá druhým elučním pufrém.

Svrchu uvedeným způsobem je možno dosáhnout vysokého stupně čištění glykoproteinu ze živného prostředí, takže je tento postup možno účinně použít jako první stupeň vícestupňového postupu.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu je možno postupovat tak, že se živné prostředí, které obsahuje požadovaný glykoprotein, který má být izolován, podrobí postupu, který spočívá v tom, že se

- a) zfiltrované živné prostředí uvede do styku s chromatografickou maticí, nesoucí dihydroxyboronylový materiál,
- b) matrice se vymývá prvním elučním pufrém a eluát se přímo uvede do styku s aniontoměničovou maticí, nesoucí kvartěrní amoniiové funkční skupiny,
- c) matrice se vymyje druhým elučním pufrém,
- d) provede se ultrafiltrace při použití membrány, oddělující látky s molekulovou hmotností 5000 až 30 000,
- e) provede se případná diafiltrace k výměně pufru za jiný pufr, který je vhodný k provádění následujícího stupně,

- f) provádí se gelová filtrace při použití pryskyřice, oddělující látky s molekulovou hmotností v rozmezí 5000 až 250 000.
-

Podle dalšího výhodného provedení spočívá způsob podle vynálezu v tom, že se

- a) živné prostředí kultury upraví na pH 7,5 až 9,0 a uvede se do styku s chromatografickou maticí s dihydroxyboronylovými skupinami v rovnovážném stavu s prvním ekvilibračním pufrém, kterým je vodný pufr s koncentrací 25 až 100 mM s iontovou silou v rozmezí 2 až 20 mS/cm² a s pH v rozmezí 7,5 až 9,0,
- b) matrice se nejprve promyje prvním ekvilibračním pufrém a pak tímtéž pufrém s obsahem 10 až 100 mM nízkomolekulární sloučeniny, obsahující 1,2-cis-diolové skupiny,
- c) eluce se provádí prvním elučním pufrém, kterým je vodný pufr o pH v rozmezí 7,5 až 11,0 s obsahem sloučeniny s 1-hydroxy, 2-aminoskupinami v koncentraci 20 až 200 mM, popřípadě v přítomnosti 2 až 8 M chaotropního činidla, 2 až 40 mM akceptoru kyanátových skupin a 0,01 až 0,1 % hmotnostních smáčedla,
- d) eluát se uvede do styku s aniontoměničovou maticí, nesoucí kvarterní amoniové funkční skupiny, v rovnovážném stavu s druhým ekvilibračním pufrém, kterým je vodný pufr o pH 7,5 až 11,0, obsahující 0,01 až 0,1 % hmotnostních smáčedla,
- e) matrice se promyje druhým ekvilibračním pufrém a pak tímtéž pufrém, obsahujícím navíc až 50 mM soli,
- f) eluce se provádí druhým elučním pufrém o pH 7,5 až 11,0 v přítomnosti 0,01 až 0,1 % hmotnostních smáčedla a 150 až 350 mM soli,

- g) provede se ultrafiltrace při použití membrány, oddělující látky s molekulovou hmotností 5000 až 30 000,
- h) provede se případná diafiltrace k výměně pufru za jiný pufr, který je vhodný k provedení následující filtrace na gelu a
- i) provede se filtrace na gelu při použití separační pryskyřice, oddělující látky s molekulovou hmotností v rozmezí 5000 až 250 000.

Pod pojmem "chromatografická matrice s obsahem dihydroxyboronylových skupin" se rozumí jakákoliv známá chromatografická matrice, která nese boritanovou funkci, v níž je atom boru stabilně vázán na uhlíkový řetězec, v němž proximální uhlíkový atom má dostatečnou hustotu volných elektronů k tomu, aby zůstal vázán na atom boru za různých podmínek použití. S výhodou je tento proximální uhlíkový atom atom aromatické skupiny, například atom uhlíku, tvořící součást benzenového kruhu, popřípadě substituovaného. Zvláště výhodné jsou pro použití k provádění způsobu podle vynálezu tak zvané fenyloboritanové pryskyřice. Jako příklad těchto pryskyřic je možno uvést pryskyřice, uvedené v US patentových spisech č. 4 562 251, 4 778 888 a 4 269 605. Z těchto látek jsou v současné době nejvýhodnější matrice z agarosy s fenyloboritanovými skupinami. Tyto matrice se běžně dodávají například od Amicon Inc nebo Grace Inc. pod obchodními názvy MATREX GEL, jde například o typy MATREX GEL PBA-10, PBA-30 a PBA-60. V případě, že je tento stupeň zařazen jako první stupeň postupu, prováděného ve více stupních, je nejvýhodnějším materiálem pro toto použití agarosa s fenyloboritanovými skupinami, dodávaná pod názvem MATREX GEL PBA-60, v níž je kyselina m-aminofenyloboritá kovalentně vázána na agarosu s velikostí částic v rozmezí 50 až 150 mikrometrů

při částicích kulovitého tvaru, obsaženo je 60 až 100 mikrom kyseliny borité/ml gelu. Pro další stupně čištění jsou však výhodnější jiné agarosové matrice s obsahem fenyloboritanových skupin, například MATREX GEL PBA-30, v níž je kyselina m-aminofenyloboritá kovalentně vázána na agarosu, jejíž kulovité částice mají průměr 50 až 150 mikrometrů, množství kyseliny je 30 až 50 mikrom kyseliny borité/ml gelu.

V současné době je nejvhodnější použití těchto chromatografických matic při chromatografii, prováděné na sloupci, i když použití těchto materiálů v jiných systémech není zcela vyloučeno.

Při použití při chromatografii na sloupci se chromatografická matrice se svrchu uvedenými funkčními skupinami s výhodou užívá při teplotě místnosti, zvláště výhodné při teplotě 5 až 25 °C a zejména 10 až 20 °C, nejvýhodnější teplota je 15 °C.

Svrchu uvedený "první ekvilibrační pufr" se s výhodou volí ze skupiny glycin, fosfáty, trialkylamoniumhydrogenuhlitan a kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinoethanosulfonová, HEPES, v uvedené koncentraci, iontové síle a pH. Zvláště výhodná koncentrace pro tento první ekvilibrační pufr je koncentrace přibližně 50 mM, zvláště výhodná hodnota pH je přibližně 8,5 a výhodná vodivost přibližně 2,5 mS/cm². Tyto výhodné podmínky je možno použít jak v případě, že je uvedený postup zařazen jako první stupeň nebo jako kterýkoliv další stupeň postupu, prováděného ve více stupních.

Svrchu uvedená "nízkomolekulární sloučenina s obsahem 1,2-cis-diolových skupin" může být jakákoliv známá nízkomolekulární sloučenina, která obsahuje uvedené skupiny, to znamená, že obsahuje nejméně dvě hydroxyskupiny na sousedních

atomech uhlíku tak, aby mohla vzniknout přibližně rovinná konfigurace. Representativními příklady těchto látek, které jsou běžně známy, mohou být polyoly s krátkým otevřeným řetězcem, například sorbitol, mannitol, adonitol, arabitol, glycerol, erythritol a cis-inositol a také monosacharidy s uzavřeným řetězcem, jako ribosa a mannosa, velmi výhodný je sorbitol. Zvláště výhodné je použití nízkomolekulární látky s obsahem 1,2-cis-diolových skupin v koncentraci přibližně 50 mM v případě, že běží o první stupeň čištění, kdežto v případě použití tohoto postupu v některém následujícím stupni je výhodná koncentrace této látky 20 až 100 mM, nejvýhodnější je koncentrace 100 mM.

Svrchu uvedená "sloučenina, obsahující 1-hydroxy-2-aminoskupiny", která tvoří hlavní složku prvního elučního pufru, může být jakákoliv sloučenina, která obsahuje uvedené funkční skupiny a může vytvořit vodný pufr se svrchu uvedeným rozmezím pH. Jako příklad takových sloučenin je možno uvést 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, který je uváděn také jako tris nebo tris(hydroxymethyl)aminoethan, dále bis(hydroxymethyl)aminoethan, N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethylethyl)/)glycin, uváděný také jako tricin a N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycin, uváděný také jako bicin. Tyto látky se s výhodou užívají v koncentraci 20 až 100 mM, přičemž v případě prvního stupně čištění se obvykle užívá koncentrace 50 mM. První eluční pufr se s výhodou upravuje na pH přibližně 8,5.

V případě použití v některém z následujících stupňů čištění je výhodné koncentrační rozmezí 20 až 150 mM, nejvýhodnější je koncentrace 100 mM. Také pro toto použití je v současné době výhodnou sloučeninou tris.

Výhodné podmínky eluce v případě použití chromatografie na matrici, obsahující fenylboritanové skupiny jako

druhého chromatografického stupně zahrnují použití elučního pufru, obsahujícího 100 mM tris a 100 mM sorbitolu.

S výhodou obsahují "druhý ekvilibrační pufr" a "druhý eluční pufr" svrchu uvedenou sloučeninu s obsahem 1-hydroxy, 2-aminoskupin jako svou hlavní složku. V těchto případech je výhodná koncentrace uvedené látky 20 až 200 mM.

Pod pojmem "chaotropní činidlo" se rozumí činidlo, které napomáhá přeměně bílkovinného materiálu na vhodnou sůl a tím i solubilizaci tohoto materiálu ve vodném prostředí, obecně v důsledku svých disociačních vlastností.

Jako příklady chaotropních činidel je možno uvést močovinu a její deriváty a také guanidin. V případě použití chaotropního činidla se toto činidlo užívá v koncentračním rozmezí 2 až 8 M, s výhodou 4 až 6 M.

Akceptorem kyanátových skupin může být jakákoliv známá sloučenina, která je schopna rychle vázat ionty CNO^- , které se mohou vytvořit při hydrolýze močoviny. Výhodným akceptorem kyanátových skupin je glycin. V případě jeho použití při provádění způsobu podle vynálezu se glycin s výhodou užívá v koncentraci 2 až 40 mM, zvláště 20 mM.

Pod pojmem "smáčedlo" se v průběhu přihlášky rozumí jakákoliv známá látka, která snižuje povrchové napětí, to znamená síly, působící na povrchu kapalin s tendencí zmenšit jejich povrch. Výhodnými příklady smáčedel mohou být zvláště polyoxyethylensorbitanové deriváty mastných kyselin, známé pod obchodním názvem Tween, velmi výhodnou látkou pro toto použití je zejména Tween 20, to znamená polyoxyethylensorbitanmonolaurát. V případě svého použití se smáčedlo užívá v koncentraci 0,01 až 0,1 %, s výhodou 0,01 % hmotnostních.

Svrchu uvedená aniontoměničová matrice, obsahující kvarterní amoniové funkční skupiny může být jakákoliv běžně dodávaná matrice tohoto typu. Výhodné pro toto použití jsou matrice na bázi agarosy nebo celulosy, například na bázi mikrokryсталické celulosy nebo zesítěné agarosy. Zvláště výhodné jsou také ty matrice, které obsahují diethylaminoethylové, triethylaminomethylové nebo trimethylaminomethylové funkční skupiny.

Zvláště výhodnou aniontoměničovou maticí je zesítěná agarosa s trimethylaminomethylovými skupinami, která se běžně dodává například pod názvem Q-Sepharose (Pharmacia AB). Chromatografie s použitím takové matrice se s výhodou provádí na sloupci při teplotě místnosti.

V případě, že se do promývacího nebo elučního pufru přidává sůl, tak jak bylo svrchu uvedeno, je účelem tohoto přidání zvýšení iontové síly pufru, jak se to běžně provádí. K uvedenému účelu je proto možno použít kteroukoliv z běžně užívaných solí. Jednou z nejčastěji používaných solí je v tomto případě chlorid sodný.

Ultrafiltrační stupeň je možno uskutečnit běžným způsobem při použití systému s tangenciálním průtokem nebo systému, tvořeného komorou s míchaným obdahem. Použitou membránou je s výhodou polysulfonová membrána nebo membrána z regenerované celulosy, může jít o běžně dodávané typy membrán, například od Millipore Inc. nebo Amicon Inc. K provádění způsobu podle vynálezu jsou vhodné zvláště takové membrány, jimiž je možno oddělit sloučeniny od molekulové hmotnosti 10 000.

Ultrafiltrát se pak popřípadě podrobí diafiltraci, opět známým způsobem a s výhodou v tomtéž pufru, který se pak užije pro následnou filtraci na gelu. Jako pufr pro tuto

filtraci na gelu je například možno použít vodný pufr o pH v rozmezí 6 až 8. Svrchu uvedená sůl je v tomto pufru přítomná s výhodou v rozmezí 100 až 200 mM a zvláště v množství 100 mM, pH se pohybuje v rozmezí 7,4 až 7,5.

K provádění tohoto stupně způsobu podle vynálezu je možno použít běžné matrice pro filtraci na gelu. Jako příklady těchto matric je možno uvést polydextrany, zesítěné působením akrylamidů, například hydrofilní gely s vysokou mechanickou pevností, připravené kovalentním zesítením allyldextranu působením N,N'-methylenbisakrylamidu, použít je možno také gely na bázi zesítěné celulosy. Zesítěné dextranakrylamidové gely jsou běžně dodávány a jsou známe například pod obchodním názvem Sephacryl (Pharmacia AB). Výhodným gelem tohoto typu je Sephacryl S-200 HR s průměrem částic 25 až 75 mikrometrů, jehož zesítení je řízeno tak, aby byly odděleny globulární bílkoviny s molekulovou hmotností v rozmezí 5000 až 250 000.

Jako příklad zesítených gelů na bázi celulosy je možno uvést běžně dodávané porézní gely ze zesítěné celulosy, například GLC 300 s průměrem částic v rozmezí 44 až 125 mikrometrů nebo GLC 1000 se středním průměrem částic 53 až 125 mikrometrů (Amicon, Inc.).

Způsob podle vynálezu je zvláště vhodný k provádění ve velkém měřítku vzhledem k tomu, že je tvořen řadou postupů, které je snadno možno za sebou zařadit bez obvyklých nevýhod těchto stupňů.

Mimoto se při provádění způsobu podle vynálezu používá pouze vodných rozpouštědel, což přináší další výhodu, jak bude každému odborníku zcela zřejmé.

Mimoto je tímto způsobem možno postupovat od prvního chromatografického stupně, to znamená od stupně, prováděného na matici s dihydroboritanovými skupinami do druhého chromatografického stupně s použitím aniontoměničové matrice přímým přenesením eluátu z prvního stupně do druhého stupně bez nutnosti výměny nebo úpravy rozpouštědla.

Tato skutečnost může usnadnit celý postup, avšak mimoto přispívá ke zvýšení celkového výtěžku.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno izolovat produkt typu erythropoetinu s průměrnou specifickou účinností 145 000 až 175 000 jednotek ELISA/mg, přičemž se vychází ze zfiltrovaného živného prostředí s průměrnou specifickou účinností 500 až 2000 jednotek ELISA/mg.

Kombinace prvního a druhého chromatografického stupně mimoto dovoluje 60 až 100-násobné čištění tohoto materiálu, přičemž pro úplný postup, provedený ve všech stupních je celkový faktor čištění výsledné látky 110 až 150.

V případě erythropoetinu je produkt, získaný na konci způsobu podle vynálezu možno izolovat jako pevnou látku po odstranění solí a po lyofilizaci běžným způsobem, nebo je možno uskutečnit v získaném roztoku výměnu rozpouštědla, například diafiltrací k získání roztoku, vhodného pro výrobu farmaceutických prostředků, například podle patentového spisu EP 430 200.

Praktické provedení vynálezu bude vysvětleno následujícími příklady, které však nemají v žádném případě sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Chromatografie na matrici s fenyboritanovými skupinami
jako první stupeň čištění erythropoetinu

Supernatant z kultury buněk, produkujících lidský erythropoetin, získaný například způsobem podle příkladu 21 mezinárodní patentové přihlášky WO 93/09222 nebo podle mezinárodní patentové přihlášky WO 94/12650 a obsahující přibližně 20 mg erythropoetinu se zfiltruje při použití běžně dodávaného prostředku, obsahující membránu s průměrem otvorů 1,2 a 0,5 mikrometrů (Opticap, Millipore Inc.). Pak se materiál podrobí ultrafiltraci na běžně dodávaném prostředku, obsahující membránu z regenerované celulosy SLY30 (Amicon Inc.) a odděluje sloučeniny s molekulovou hmotností 30 000, pak se provádí diafiltrace při použití vody a 0,05M HEPES o pH 8,5, vodivost 2,5 mS/cm². Ultrafiltrát se nanese na chromatografický sloupec s obsahem nabobtnané agarosy s fenyboritanovými skupinami, užije se 120 ml agarosy PBA 60 (Amicon Inc.) v rovnovážném stavu s 0,05 M HEPES o pH 8,5 s obsahem 0,1 % Tween 20 (pufr A), sloupec se udržuje na teplotě 10 až 15 °C chlazením vodou. Rychlost průtoku se nastaví na 2 až 4 objemy sloupce, CV, za hodinu. Po promytí pufr A až do stabilizace základní čáry podle optické hustoty OD při 280 nm se sloupec dále promývá při použití 0,05 M HEPES o pH 8,5 s obsahem 0,01 % Tween 20 a 0,05 M sorbitolu (pufr B). Eluce se provádí při použití 0,02 M tris o pH 8,5 s obsahem 6 M močoviny, 0,02 M glycinu a 0,01 % Tween 20 (pufr C) a materiál, který se vymývá v hlavním vrcholu při sledování OD při 280 nm se izoluje, tento materiál má přibližně 4 až 5-násobný objem sloupce, získá se ve výtěžku 70 až 80 % a produkt je v něm čištěn přibližně dvacetkrát. Materiál se

pak přímo nanese na sloupec zesítěné agarosy s trimethylaminomethylovými skupinami jako aniontoměničové pryskyřice, užije se 25 ml nabobtnané pryskyřice Q-Sepharose FF, (Pharmacia AB) v rovnovážném stavu s 0,02 M tris o pH 8,5 s obsahem 0,01 % Tween 20 (pufr D). Po promytí pufr D při stálé rychlosti průtoku až do stabilizace základní čáry se pak sloupec promývá tímtéž pufr D, který navíc obsahuje 0,05 M chloridu sodného (pufr E), k eluci se užije 0,02 M tris o pH 8,5 s obsahem 0,01 % Tween 20 a 0,15 M chloridu sodného (pufr F). Materiál z oblasti vrcholu při sledování OD při 280 nm se izoluje, výtěžek je přibližně 80 %. Materiál se pak koncentruje ultrafiltrací při použití komory s míchaným obsahem a membránou, schopnou oddělit sloučeniny od molekulové hmotnosti 10 000 (YM10, Amicon).

Koncentrovaný roztok se nanese na sloupec, obsahující gel zesítěného dextranu s akrylamidem Sephacryl S 200 (Pharmacia AB), v rovnovážném stavu 0,02 M Tris o pH 7,4 s obsahem 0,15 M NaCl (pufr G), sloupec se vymývá týmž pufr D. Odebírájí se jednotlivé frakce, frakce s obsahem erythropoetinu (detekce zkouškou ELISA) se spojí a koncentrují ultrafiltrací svrchu uvedeným způsobem.

Příklad 2

Chromatografie na materiálu s fenylboritanovými skupinami jako jeden z dalších stupňů při čištění erythropoetinu

Roztok částečně čištěného lidského erythropoetinu, získaného z produkčních buněk způsobem podle příkladu 21 mezinárodní patentové přihlášky WO 93/09222 nebo podle WO 94/12650 a obsahující přibližně 20 mg erythropoetinu se podrobí diafiltraci nebo dialýze proti vodě a 0,05 M HEPES o pH 8,5 s 0,15 M NaCl při vodivosti 18 mS/cm². Pak se

materiál nanese na chromatografický sloupec agarosy s fenylboritanovými skupinami, užije se 120 ml nabobtnané pryskyřice PBA 30 (Amicon Inc.) v rovnovážném stavu v 0,05 M HEPES o pH 8,5 s obsahem 0,15 M NaCl (pufr A'), sloupec se udržuje na teplotě 10 až 15 °C chlazením vodou. Rychlost průtoku se upraví na 2 až 4 objemy sloupce CV za hodinu. Sloupec se promývá pufr A' až do stabilizace základní čáry při optické hustotě OD při 280 nm. K eluci se užije 0,10 M Tris o pH 8,5 s obsahem 0,1 M sorbitolu (pufr B'), materiál, který tvoří obsah vrcholu při OD při 280 nm se oddělí, objem tohoto materiálu je přibližně 4 až 5 CV, výtěžek je přibližně 90 %.

Analytické postupy

ELISA

Specifická účinnost erythropoetinu, získaného způsobem podle vynálezu se měří metodou ELISA pro lidský erythropoetin EPO. Postup je známý a zkušební balíček se běžně dodává pod obchodním názvem QUANTIKINE IVD (R and D Systems).

Analýza bílkovin

Zkoušky na bílkovinu se provádějí při použití zkušebního balíčku BCA protein Assay (Pierce Chemical Co.). Jde o postup, který kombinuje biuretovou reakci (redukce bílkovin pomocí Cu^{2+} na Cu^{1+} v alkalickém prostředí) s vysoce specifickou reakcí kyseliny bicinchonové BCA na Cu^{1+} .

Specifická účinnost

Specifickou účinnost jednotlivých vzorků je možno vypočítat podle následující rovnice:

Specifická účinnost = počet jednotek erythropoetinu při
~~zkoušce ELISA/mg bílkoviny při BCA.~~

Čištěný erythropoetin má specifickou účinnost přibližně 200 000 jednotek ELISA/mg bílkoviny při BCA. Specifická účinnost, zjištěná při zkoušce ELISA je pouze nepřímo spojena se skutečnou biologickou účinností erythropoetinu. Z tohoto důvodu se obvykle provádí ke stanovení specifické účinnosti in vivo biologická zkouška, která je v oboru dobře známa a k níž se užívají polycythemické myši, které prodělaly období sníženého zásobení kyslíkem. Tímto způsobem je možno zjistit specifickou účinnost vzorku a vyjádřit ji v mezinárodních jednotkách/mg bílkoviny, jak je v oboru běžné.

Analýza HPLC

Zařízení: Systém Waters 616 LC, opatřený detektorem PDA model 996.

Sloupec: Vydac pro bílkoviny, C₄, 3 mikrometry, 4,6 x 250 mm.

Mobilní fáze: A) 0,1% vodná kyselina trifluoroctová a acetonitril 95 : 5, B) 0,1% vodná kyselina trifluoroctová a acetonitril 5 : 95.

Gradient: min (%B): 5 (5), 50 (95).

Rychlost průtoku: 1 ml/min.

Analýza SDS-PAGE

Analýza SDS-PAGE se provádí na Phas System (Pharmacia AB), densitometrická měření se provádějí na průtokovém densitometru Flying spot CS-9301 PC (Shimadzu Co), podle návodu výrobce běžným způsobem.

Analytické údaje a výsledky

Při hodnocení produktu, získaného z řady zkoušek se specifická účinnost erythropoetinu v supernatantu buněčné kultury pohybovala v rozmezí 500 až 2000 jednotek ELISA/mg. Specifická účinnost erythropoetinu po prvním chromatografickém stupni se pohybovala v rozmezí 35 000 až 95 000 jednotek ELISA/mg. Specifická účinnost erythropoetinu na konci čištění podle příkladu 1 se pohybovala průměrně v rozmezí 145 000 až 175 000 jednotek ELISA/mg.

Podle výsledků analýzy HPLC a podle SDS-PAGE tak, jak bylo svrchu uvedeno, je možno prokázat, že erythropoetin tvořil na konci postupu více než 92 % plochy pod křivkou AUC.

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob čištění erythropoetinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- a) materiál s obsahem erythropoetinu nanese na chromatografickou matici s dihydroxyboronylovými skupinami, předem uvedenou do rovnovážného stavu v prvním ekvilibračním pufru,
- b) sloupec se promyje ekvilibračním pufrům a
- c) eluce se provádí vodným pufrům o pH v rozmezí 7,5 až 11 s obsahem sloučeniny s 1-hydroxy-2-aminoskupinami a 1,2-cis-diolovými skupinami.

2. Způsob čištění erythropoetinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- a) zfiltrované živné prostředí s obsahem glykoproteinu, který má být izolován, uvede do styku s chromatografickou maticí s dihydroxyboronylovým materiálem, předem uvedenou do rovnovážného stavu,
- b) matrice se promyje prvním elučním pufrům a tento eluát se přímo uvede do styku s aniontoměničovou maticí s kvarterními amoniiovými funkčními skupinami a
- c) glykoprotein se vymývá druhým elučním pufrům.

3. Způsob čištění erythropoetinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- a) zfiltrované živné prostředí s obsahem glykoproteinu, který má být izolován, uvede do styku s chromatografickým materiálem s obsahem dihydroxyboronylových skupin, předem uvedeným do rovnovážného stavu v prvním ekvilibračním pufru,

- b) eluce se provádí prvním elučním puřrem,
- c) eluát se římó uvede do styku s aniontoměničovou matričí s obsahem kvarterních amoniových skupin,
- d) provede se eluce druhým elučním puřrem,
- e) provede se ultrafiltrace při použití membrány, odděluřící látky od molekulové hmotnosti 5000 až 25 000,
- f) popřípadě se provede diafiltrace k výměně puřru za puřr, vhodný pro následující stupeň a
- g) provede se gelová filtrace při použití pryskyřice, odděluřící materiály s molekulovou hmotností v rozmezí 5000 až 250000.

4. Způsob řiřtění erythropoetinu, v y z n a ř u j í -
c í s e t í m , ř e se

- a) řivné prostředí kultury upraví na pH 7,5 až 9,0 a uvede se do styku s chromatografickou matričí s dihydroxyboronylovými skupinami v rovnovážném stavu s prvním ekvilibračním puřrem, kterým je vodný puřr s koncentrací 25 až 100 mM s iontovou silou v rozmezí 2 až 20 mS/cm² a s pH v rozmezí 7,5 až 9,0,
- b) matriče se nejřve promyje prvním ekvilibračním puřrem a pak tímteř puřrem s obsahem 10 až 100 mM nízkomolekulární sloučeniny, obsahující 1,2-cis-diolové skupiny,
- c) eluce se provádí prvním elučním puřrem, kterým je vodný puřr o pH v rozmezí 7,5 až 11,0 s obsahem sloučeniny s 1-hydroxy, 2-aminoskupinami v koncentraci 20 až 200 mM, popřípadě v řítomnosti 2 až 8 M chaotropního řinidla, 2 až 40 mM akceptoru kyanátových skupin a 0,01 až 0,1 % hmotnostních smáředla,

- d) eluát se uvede do styku s aniontoměničovou maticí, nesoucí kvartérní amoniové funkční skupiny, v rovnovážném stavu s druhým ekvilibračním pufrém, kterým je vodný pufr o pH 7,5 až 11,0, obsahující 0,01 až 0,1 % hmotnostních smáčedla,
- e) matrice se promyje druhým ekvilibračním pufrém a pak tímtéž pufrém, obsahujícím navíc až 50 mM soli,
- f) eluce se provádí druhým elučním pufrém o pH 7,5 až 11,0 v přítomnosti 0,01 až 0,1 % hmotnostních smáčedla a 150 až 350 mM soli,
- g) provede se ultrafiltrace při použití membrány, oddělující látky s molekulovou hmotností 5000 až 30 000,
- h) provede se případná diafiltrace k výměně pufru za jiný pufr, který je vhodný k provedení následující filtrace na gelu a
- i) provede se filtrace na gelu při použití separační pryskyřice, oddělující látky s molekulovou hmotností v rozmezí 5000 až 250 000.

5. Způsob podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako chromatografický materiál s dihydroxyboronylovými skupinami použije agarosa s fenylboritanovými skupinami.

6. Způsob podle některého z nároků 1, 2, 3 nebo 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se první ekvilibrační pufr volí ze skupiny glycin, fosfát, trialkylamonium-hydrogenuhličitán a kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako první ekvilibrační pufr užije kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonová v koncentraci 0,05 M.

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pH prvního ekvilibračního pufru má hodnotu 8,5.

9. Způsob podle některého z nároků 1 nebo 4 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se sloučenina s nízkou molekulovou hmotností s obsahem 1,2-cis-diolových skupin volí ze skupiny polyolů s nízkou molekulovou hmotností a přímým řetězcem, jako jsou sorbitol, mannitol, adonitol, arabitol, glycerol, erythritol a cis-inositol a z monosacharidů s uzavřeným řetězcem, jako jsou ribosa a monosa.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako sloučenina s nízkou molekulovou hmotností s obsahem 1,2-cis-diolových skupin užije sorbitol.

11. Způsob podle nároku 9 nebo 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se sloučenina s nízkou molekulovou hmotností s obsahem 1,2-cis-diolových skupin užije v koncentraci 0,05 M.

12. Způsob podle některého z nároků 1 nebo 4 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že druhý ekvilibrační pufr obsahuje sloučeninu s obsahem 1-hydroxy-2-aminoskupin v koncentraci 0,02 až 0,2 M.

13. Způsob podle některého z nároků 1 nebo 4 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že druhý eluční pufr obsahuje sloučeninu s obsahem 1-hydroxy, 2-aminoskupin v koncentraci 0,05 M.

14. Způsob podle některého z nároků 4 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se sloučenina s obsahem 1-hydroxy, 2-aminoskupin volí ze skupiny, zahrnující 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, bis(hydroxymethyl)aminoethan, N-/2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethylethyl)/-glycin a N,N-bis(-2-hydroxyethyl)glycin.

15. Způsob podle některého z nároků 4 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se chaotropní činidlo volí z močoviny, derivátu močoviny a guanidinu.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako chaotropní činidlo užije 6 M močovina.

17. Způsob podle některého z nároků 4 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako akceptor kyanátových skupin užije glycin.

18. Způsob podle některého z nároků 3 až 17, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aniontoměničová pryskyřice, nesoucí kvarterní amoniové funkční skupiny, volí ze skupiny, zahrnující mikrokrytalickou celulosu nebo zesítěnou agarosovou matici, nesoucí diethylaminoethylové, triethylaminomethylové nebo trimethylaminomethylové funkční skupiny.

19. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako aniontoměničová matrice užije trimethylaminomethylagarosa.

20. Způsob podle některého z nároků 3 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se k filtraci na gelu užije zesítěný dextranakrylamidový gel s řízenou velikostí otvorů.

Zastupuje: