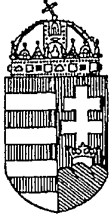


(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**204 537 B**

(21) A bejelentés száma: 6264/88  
(22) A bejelentés napja: 1988. 10. 19.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
111 886 1987. 10. 23. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 88/03589  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 89/03840

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 07 K 3/22**  
C 12 P 21/02  
B 01 J 39/06

(40) A közzététel napja: 1990. 08. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltalálók:

Naveh, David, Millburn, New Jersey (US)  
Tang, John Chu-Tay, Livingston, New Jersey (US)

(73) Szabadalmas:

Schering Corp., Kenilworth, New Jersey (US)

(54)

## Eljárás GM-CSF tisztítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya ioncserés kromatográfias eljárás a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) elválasztására hasonló szennyezéseket tartalmazó fehérje-keverékekből.

Az eljárás szerint az anioncserével előtisztított keverék pH-ját a GM-CSF és a szennyezések előre

meghatározott izoelektromos pontjai közötti értékre állítják be, ezen a pH-n egy erős kationcserélőn kromatografálják, a gyantáról leoldják a GM-CSF-et, kicsapják és gélzúréssel tisztítják. Kívánt esetben az egyes növeleteket megisméltik.

A találmány tárgya a hasonló szerkezetű szennyezéseket tartalmazó fehérje-keverékek elválasztására szolgáló új ioncserélő kromatográfias eljárás, amely a kívánt fehérje és a szennyezések izoelektromos pontjainak különbözőségén alapszik. A találmány szerinti eljárás eredményesen alkalmazható a granulocita-makrofág-kolónia stimuláló faktor – a továbbiakban GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) – tisztítására.

Az ioncserélő kromatográfia egyike a hagyományos kromatográfias technikáknak, amit jó kezelhetősége, olcsósága, nagy teljesítőképessége és a léptéknövelés egyszerű volta miatt igen széles körben alkalmaznak, máig nincs azonban egy olyan megoldása, amely lehetővé tenné a hasonló szerkezetű fehérjék – például az rDNS-(riboszomális DNS)-fehérjék – tökéletes elválasztását.

Az rDNS-fehérjék egyike a GM-CSF, ami a vérben keringve a granulociták és makrofág sejtek szaporodását és érési folyamatát serkenti. Előállítására és izolálására számos kísérlet történt, így az emberi rekombináns GM-CSF komplementer DNS-ét (cDNS) több laboratóriumban klónozzák, vagy nem rekombináns GM-CSF-et állítanak elő Mo-sejtvonalak segítségével (US 4 438 032 szabadalmi leírás). Gasson és mtsai [Science, 226, 1339–1342 (1984)] megállapították az így nyert GM-CSF N-terminálisától számított 16 aminosav szekvenciáját és felfedték, hogy az emberi GM-CSF-nek számos minor változata van és a heterogenitás a nukleotid-, mind az aminosav-szekvenciában kimutatható. Ismert például, az N-terminális alanintól számított 100. aminosav lehet treonin vagy izoleucin, ami arra utal, hogy a fehérjék többségéhez hasonlóan a GM-CSF-nek is számos allél változata létezik az emberi populációban.

A cDNS-ek, így a GM-CSF cDNS-ének előállítására és klónozására számos módszert ismerünk; az egyik – legáltalánosabb – módszer elve a következő. Kiválasztunk egy olyan sejtvonalat (például egy nem-transzformált emberi limfocita-vonalat), amely termeli a kívánt biológiai aktivitású fehérjét, majd a sejtekből izoláljuk a teljes mRNS-készletet. Az mRNS-ekről reverz transzkripcióval elkészítjük az elsődleges cDNS-szálakat, majd ezeken, mint templátokon, felépítjük a másodlagos cDNS-szálakat is. Az így nyert cDNS-szekvenciákat egy megfelelő vektorhoz (plazmidhoz vagy bakteriofághoz) kapcsoljuk jól ismert technikák (például komplementer átfedés vagy ragadós végek) segítségével, majd alkalmas gazdasejtet transzformálunk vele. Az ún. kifejező rendszerek (a vektorral bevitt idegen génnek megfelelő fehérjét termelő sejtvonalak) széles köre által termelt fehérjék tisztítása oldható meg a találmány szerinti eljárással: a gazdasejtek lehetnek például baktérium-, élesztő-, rovar- vagy emlős-sejtvonalak, de bármilyen más eredetű sejtek is.

Ismertek különböző módszerek a GM-CSF sejtvonalakkal történő előállítására és tisztítására [Blood 57, 13–21 (1981); J. Chromatography 296, 171–179 (1984); Science 228, 810–815 (1985) és 232, 506–508 (1986); Blood 69, 43–51 (1987); Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84, 4428–31 (1987)], azonban ezek egyike sem éri el jó hozammal a kívánt tisztaságot, és gyakran előfordul a biológiai aktivitás elvesztése is.

A találmány szerinti eljárás során egy nyers fehérje-keveréket először viszonylag tisztább, azaz kevesebb összetevőt tartalmazó frakciókra választunk szét, majd ezek közül a kívánt fehérjét és a hasonló szerkezetű szennyeződések tartalmazó frakciót ioncserélő gyantán, olyan pH mellett tisztítjuk tovább, ahol a kívánt fehérje és a szennyeződések nettó töltése ellentétes előjelű, és ezért szelektíven kötődnek az ioncserélő gyantához. Az ioncserélő gyanta előnyösen egy erős ioncserélő, amit ugyancsak előnyösen úgy választunk meg, hogy a kívánt fehérje kötődjön hozzá. A fehérje kinyerése ezután a gyantáról való elucióval történik.

Az ioncserélőn történő elválasztás pH-ját célszerűen úgy választjuk meg, hogy az az elválasztani kívánt fehérjék izoelektromos pontjainak közelében legyen és ahol a lehetőséghez képest maximális a kívánt fehérje és a szennyeződések nettó töltéseinek különbsége.

A találmány tárgyához tartozik továbbá, hogy az optimális elválasztáshoz megfelelő pH megválasztása érdekében meghatározzuk mind a kívánt, mind a szennyező fehérjék izoelektromos pontját. Az izoelektromos pontok meghatározása előnyösen számítógépes szimulációval vagy közvetlen méréssel (például izoelektromos fókuszálással) történhet.

A találmány szerinti eljárás alkalmas az rDNS-fehérjék, előnyösen a GM-CSF tisztítására, különösen a GM-CSF és a delta-4 GM-CSF egymástól történő elválasztására.

A fehérjék tisztításának különösen előnyös módja, ha egymás után elvégezzük a következő lépéseket:

- a) dextrán-, cellulóz-, agaróz- vagy alkilgyanta-alapú, kvaterner amin funkciós csoportú anioncserélőn,
- b) dextrán-, cellulóz-, agaróz- vagy alkilgyanta-alapú, szulfonát funkciós csoportú kationcserélőn, majd
- c) 5000 – 100 000 dalton molekulatömeg-határok között fracionáló szűrőgélen választjuk el a kívánt fehérjét a szennyeződésektől.

A találmány szerinti eljárás lényegében egy nagy feloldóképességű ioncserélő kromatográfias technika, ami jól használható nyers fehérje-keverékek, elsősorban rDNS-fehérjék elválasztására. Ebben az esetben az ioncserélést a kívánt fehérje izoelektromos pontjához igen közeli pH-n végezzük, előnyösen egy olyan pH-n, ahol a kívánt fehérje és a szennyeződések nettó töltéseinek különbsége maximális és egyúttal ellentétes is. Ilyen körülmények között az ioncserélőn a különböző fehérjék szelektív megkötődése érhető el még akkor is, ha azok abszolút töltései a zérushoz közeli értékek. A fent leírt sajátosságok miatt a találmány szerinti ioncserélő kromatográfias technikát, „Delta Izoelektromos Pont” módszernek nevezzük (DIP).

Az rDNS-fehérjéket különösen szoros szerkezeti hasonlóságuk miatt igen nehéz elválasztani egymástól a különböző kromatográfias technikákkal (például gél-szűrés, ioncserélés, hidrofób kötődés, fordított fázisú folyadékkromatográfia, fémkelát-affinitási kromatográfia, stb.). A kívánt fehérje és a szennyeződések közel

azonos molekulatömegű és töltéseloszlású fehérjék, és az utóbbiaknak hiányzik egy (néha több) töltést hordozó aminosavjuk. Jellegzetes szennyeződések azok a fehérjék, amelyek magából a kívánt fehérjéből keletkeznek a tisztítás során, például néhány láncvégi aminosav lehasadása útján, ami könnyen előfordul akár fehérjebontó enzimek jelenléte, akár az ioncserélő gyantával való kölcsönhatás miatt. Az ilyen szennyeződések a hagyományos kromatográfiás technikákkal egyszerűen eltávolíthatatlanok.

A DIP technika számos szempontból különbözik a hagyományos ioncseréléstől. A pH olyan, hogy a fehérjék nettó elektromos töltése minimális mértékű, tehát az ioncserélő gyanta aktiválási pH-ja csak az egység törtrészeivel különbözhet a kívánt fehérje és a szennyeződések izoelektromos pontjától. Ez élesen különbözik a hagyományos technikáktól, ahol a kívánt fehérje nettó töltésének maximalizálására törekszünk, azaz a gyanta aktiválási pH-ja legalább 1-2 egységgel különbözik a fehérje izoelektromos pontjától (a különbség legalább egy nagyságrenddel meghaladja a DIP technika által megkívántat.)

A DIP technika kivitelezéséhez a pH-t, azaz a kívánt és a szennyező fehérjék izoelektromos pontjait előre meg kell határozni. Ez történhet a pH-töltéseloszlás függvények számítógépes megoldásával vagy közvetlen analitikai mérésekkel, például izoelektromos fókuszálással. A hagyományos ioncserélés esetén erre nincs szükség, mivel a kívánt fehérje töltésmennyiségeinek maximalizálását könnyen elérhetjük a fiziológiaiástól távoli pH beállításával, s ezért a körülményeket csak empirikus úton szokták optimalizálni. Egyetlen hagyományos technika esetén sem takarítható meg azonban az a fáradságos munka, amit a megfelelő leoldási (elúciós) körülmények kikísérletezése jelent.

Egy további különbség, hogy a hagyományos technikák esetében nem fordítanak gondot a kívánt fehérje és a szennyeződések töltéseinek polarizálására, míg a DIP technika során alkalmazott pH-t az egymástól elválasztani kívánt fehérjék – egyébként egymáshoz igen közeli értéket mutató – izoelektromos pontjai közé állítjuk be és így elérjük, hogy a töltésük ellentétes előjelű lesz.

A DIP technikában a fehérjéket nagy ionerősségű oldatban visszük fel az ioncserélőre, mert így csökkenthetjük a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat és erős ioncserélőt alkalmazunk. Ez éppen a fordítottja a hagyományos ioncserélés körülményeinek. A fehérje-fehérje kölcsönhatás kiiktatása azt eredményezi, hogy már a feltöltés során megtörténik a fehérjék szétválása, amit egy gradiens-elúcióval teljessé tehetünk. A hagyományos technika esetén a feltöltés alatt nem szelektív, egyenletes felkötődés történik, elválasztás csak az elúció során van, és az egymáshoz is kötődő fehérjemolekulák eloszlása sem egyenletes az aktív felületen.

A fehérjék felületi töltéseloszlásának pH-függését kereskedelemben kapható programokkal bármely alkalmas számítógépen (mainframe, mikro- vagy személyi számítógép) kiszámíthatjuk és megjeleníthetjük. Megfelelőnek bizonyult erre például egy Vax számítógép

(Digital Corp.) az Intellegentics, Inc. „Polypeptid Analysis System” (1981–1986) című programjával, amely a primer aminosav-szekvenciát használja kiinduló adatnak a számításhoz. A fehérjék izoelektromos pontja egyébként meghatározható a szakemberek előtt közismert izoelektromos fókuszálással is.

A DIP kromatográfiás technika különösen olyan fehérjék esetében alkalmazható, amelyek nem denatúrolódnak az izoelektromos pontjukhoz közeli pH-tartományban. Számos fehérje izoelektromos pontja ismert az irodalomból [lásd például Righetti és mtsai, „Isoelectric Points and Molecular Weights of Proteins – A New Table”, *J. Chrom.*, 220, 115-194 (1981)], és közöttük sok olyan van, amelyek esetében a DIP technika jól alkalmazható. Példaként említhetjük a GM-CSF-en kívül a leukocita- és limfoblaszt-interferonokat, a növekedési hormont, a szuperoxid-diszmutázt, az eritropoietint, az antitrombin III-at, a laktogént, a plazminogént, a prolaktint, az urokinázt vagy a B<sub>12</sub>-vitaminkötő fehérjét.

A DIP technika alkalmazásának előnyei jól észrevehetőek, ha az emberi rekombináns GM-CSF tisztítását vizsgáljuk. A GM-CSF készítményekben mindig jelen van az N-terminális végéről négy aminosavat elvesztett, úgynevezett delta-4 GM-CSF is, amitől a korábbi tisztítási eljárások során – kvaterner amino-etil aktív csoportos anioncseréléssel, gélszűrőssel vagy fordított fázisú kromatográfiával – nem lehetett teljesen megszabadulni. A DIP technikával azonban ez jól megoldható. A két molekulára elvégzett számítások azt mutatták, hogy a GM-CSF izoelektromos pontja 5,24, a delta-4 származéké pedig 4,98. Ezután megkerestük azt a pH-értéket, ahol a) a GM-CSF töltése ellentétes előjelű a delta-4 szennyezéséhez képest és b) a nettó töltések különbsége maximális. A két fehérje között 1 töltés/mól különbség van minden pH-érték mellett (például pH=0,5 esetén +16 és +15, pH = 11,5 esetén -11,1 és -12), de pH=5 esetén a töltésük ellenkező előjelűvé válik (+0,9 és -0,1).

Az *Escherichia coli* gazdasejtben klónozással termelt GM-CSF nyerspreparátumok a gazdasejtből származó, alacsony izoelektromos pontú szennyező fehérjéket és proteolitikus faktorokat is tartalmaznak. Az ilyen szennyezések elválasztását hatékonyan segíti a nagy ionerősség, ami megakadályozza a fehérjemolekulák egymás közötti elektrosztatikus kapcsolódását.

A nagy ionerősségű, pH=5 körüli kémhatású fehérjeoldatok elválasztásához alkalmas erős ioncserélő lehet például egy dextrans-, cellulóz-, agaróz- vagy akrilgyanta-alapú, szulfonát funkció csoportú kationcserélő (például a Pharmacia által gyártott S-Sepharose). Egy ilyen ioncserélő oszlop alkalmazásával sikerült egyetlen lépésben megtisztítanunk egy nyers preparátumot az alábbi szennyeződésektől: a delta-4 származéktól, az alacsony izoelektromos pontú coli-fehérjéktől, egy 20 kd tömegű, korábban eltávolíthatatlan colieredetű szennyeződéstől és egy proteolitikus faktortól. Ezzel az eredetileg 50%-os tisztaság 90%-osra emelkedett és a készítmény stabilis lett, a kromatográfia megismétlésével pedig elértük a 99%-os tisztaságot 70–80%-os kitermelés mellett.

G. G. Wong és munkatársai természetes és rekombináns eredetű GM-CSF-et is tisztítottak [Cancer Cells (3), szerk. Feramisco és mtsai., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1985, 235–242. old.] Eljárásuk bonyolultabb a találmány szerinti eljárásnál, ezenkívül acetonnitrilt tartalmazó eluenssel végeznek HPLC tisztítást. A kitermelések 6,6% és 53% között változnak, de a tisztított GM-CSF heterogén, és nem közlik, hogy a HPLC tisztításnál használt oldószereket eltávolították-e. A találmány szerinti eljárás módszereiben egyszerűbb és tisztább terméket eredményez, amely nincs szennyezve oldószemmaradékokkal.

A következőkben a GM-CSF izolálásának és tisztításának menetét mutatjuk be. Az anioncserélő kromatográfiás lépés (előnyösen egy kvaterner aminoetil funkció csoportú oszlopon végezve) része a hagyományos eljárásnak is, és a coli-eredetű, magas izoelektromos pontú fehérjék eltávolítását szolgálja. A szintén hagyományos gélszűrési lépés célja az alacsony és magas molekulatömegű szennyezők eltávolítása.

Bár a leírásban egy előtisztított fehérje-frakciót viszünk fel az erős ioncserélőre és átfolyó rendszerű oszlopot alkalmazunk, ezzel nem zárjuk ki a találmány szerinti eljárás olyan megvalósítási módjait, mint a nyers preparátumok ioncserélőre vitele vagy az ioncserélőnek edényben történő, szakaszos kezelése.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy az összes lépést 2–15 °C közötti hőmérsékleten végezzük. A fehérje meghatározást a coomassie-kék kötődéssel [Anal. Biochem., 72, 248–254 (1976)] mértük. Ha egy-egy lépésben nem értük el a kívánt tisztaságot, úgy azt ugyanazon az oszlopon megismételtük, szükséges esetben visszatértünk korábbi lépésekhez is. Újra feldolgoztuk az elúció során kapott mellék-frakciókat is. Az egyes lépések között a fehérjeoldat koncentrációját ammónium-szulfátos vagy izoelektromos kicsapással és/vagy ultraszűrővel állítottuk be. Az összes oldatot ionmentesített, reverz ozmózissal tisztított vagy injekció alkalmas minőségű (pro. inj.) vízzel készítettük el.

### 1. lépés

Kromatografálás kvaterner amin oszlopon

A GM-CSF-et tartalmazó nyers fehérje-preparátum pH-ját 5–7,5 közé állítjuk be 1 mólos bisz-trisz/HCL pufferrel, majd az oldatot centrifugáljuk és/vagy szűrjük. A vezetőképességét 10 ms/cm értékre állítjuk szükség szerint vízzel való hígítással vagy 4 mólos nátrium-klorid oldattal. Az oldatot ezután felvisszük a kvaterner amin oszlopra (azaz egy kvaterner amin funkció csoportokat tartalmazó anioncserélő gyantára, például a Pharmacia Q-Sepharose készítményére) úgy, hogy a fehérje/ioncserélő arány ne haladja meg az 50 g/l gél értéket. Az elúciót 0–1,4 mól határok között nátrium-klorid vagy más megfelelő só gradiensével végezzük 20 mmólos bisz-trisz/HCL pufferben. A GM-CSF-et tartalmazó frakciókat a továbbtisztítás előtt egyesítjük.

### 2. lépés

Kromatografálás szulfonát oszlopon

Az egyesített oldat pH-ját 1 mólos ecetsav- vagy 4

mólos sósav-oldattal 5,0-re állítjuk, szükség esetén 6 mólos nátrium-hidroxiddal korrigáljuk. A vezetőképességet 0,01 mólos ecetsav/NaOH pufferrel (pH=5,0) 13 ms/cm értékre állítjuk be. Az oldatot 0,2 µm-es szűrőn szűrjük és felvisszük egy szulfonát funkció csoportokat tartalmazó kationcserélő oszlopra (Sephadex S-Saepharose) 20 g fehérje/1 gél arányban. Az elúciót 0–0,5 mól határok között nátrium-klorid vagy más só gradiensével végezzük 20 mólos ecetsav/NaOH pufferben (pH = 5,0), ami 0,13 mól nátrium-kloridot is tartalmaz; a megfelelő frakciókat egyesítjük. Ezt a lépést rendszerint meg kell ismételni.

### 3. lépés

Ammónium-szulfátos kicsapás

Az egyesített frakciókhoz ammónium-szulfátot adagolunk az 50–60%-os telítettség eléréséig. A csapadékot centrifugálással kinyerjük és hűtve tároljuk.

### 4. lépés

Gélszűrés

A csapadékot megfelelő pufferben – például 10 mmól nátrium-foszfát/50 mmol citromsav pufferben (pH=6), ami 0,35 mól koncentráció-határig egy sót, például nátrium-kloridot is tartalmazhat – feloldjuk, az oldatot centrifugáljuk és 0,2 µm-es szűrőn szűrjük. Az 5000 – 100 000 dalton között frakcionál gélszűrő oszlopot (Sephadex Sephacryl S-200 HR; Pharmacia), előzőleg feltöltjük a pufferrel, majd 3,5 g fehérje/1 gél arányban felvisszük rá a fehérjeoldatot. Az elúciót ugyanazzal a pufferrel végezzük, a kellő frakciókat egyesítjük és egy pufferrel, például 10 mmól foszfát/2 mmól citrát pufferrel (pH=7,2) szemben dializáljuk. Az egész 4. lépés elvégeztető az utóbbi pufferrel is.

### 5. lépés

Utőtisztítás

A dializált fehérje-oldatot – ami a tisztított GM-CSF-et tartalmazza – még egyszer 0,2 µm vagy kisebb pórusméretű szűrőn átszűrjük és –20 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk.

Az izoelektromos pont mérésével történő meghatározásakor gélelektroforézis-technikát használunk [J. S. Fawcett: „Recent Developments in Isoelectric-focusing” in Electrophoretic Techniques, (G. F. Simpson & M. Whittaker szerk.) Academic Press, 1983, 58. old.; P. G. Righetti: „Isoelectric-Focusing: Theory, Methodology and Application”, Elsevier Biomedical Press, 1983, 148. old.; P. Gill, Electrophoresis 6, 282 (1985); M. D. Freym Electrophoresis 6, 282 (1985); M. D. Frey, Electrophorézis 3, 27–32 (1982); M. Geemäiner, Electrophoresis 3, 146 (1982)].

A továbbiakban egy példán keresztül mutatjuk be a DIP technika alkalmazását a GM-CSF tisztítására.

### 1. Példa

A GM-CSF tisztítása

Az 1. lépés: Kromatografálás kvaterner amin oszlopon

Egy GM-CSF-et kódoló DNS-t tartalmazó vektorral transzformált E. coli baktériumtörzs tenyésztésével

nyert fermentélő előszűrése után kapott 180 liter nyers, GM-CSF-tartalmú oldat pH-ját 6,0-ra állítjuk be 3,6 liter 1 mólos bisz-trisz/HCL puffer (pH=6,0) és 2,0 liter 4 mólos sósav-oldat hozzáadásával. A kivált csapadékot Sharpless centrifugában átfolyós rotorral, 0,75 l/perc rátáplálással eltávolítjuk és a felülúszó vezetőképességét hideg vízzel történő 1,55-szörös hígítással 5,5 ms/cm-re állítjuk be. A 12 liter térfogatú (25 cm átmérőjű) Q-Sephadex oszlopot 10 oszloptérfogatnyi pufferrel (20 mM bisz-trisz/HCL puffer, pH=6,0) ekvilibrálnuk, majd 43,6 liter fehérje oldatot töltünk rá, ami 20 mg fehérje/ml gyanta arányt jelent. A feltöltés után az oszlopot 120 liter ekvibrációs pufferrel mossuk (250 ml/perc átfolyás), majd lineárisan emelkedő nátrium-klorid gradienssel eluáljuk (a gradienst 78 liter 20 mmólos, 0,03 M nátrium-kloridot tartalmazó és 78 liter, 20 mmólos, 0,32 M nátrium-kloridot tartalmazó, 6,0 pH-jú bisz-trisz/HCL pufferből állítjuk elő). Az egyes frakciók 1,2 liter GM-CSF tartalmát gélelektroforézissel ellenőrizzük és az egyesített frakciókat (4,9 liter) visszük tovább.

#### 2. lépés: Kromatografálás szulfonát oszlopon

Az egyesített frakció (4,9 liter) pH-ját 5,0-re, vezetőképességét 15 ms/cm-re állítjuk be 49 ml 1 mólos ecetsav-oldat illetve 2 liter nátrium-hidroxiddal pH=5,0-re beállított 0,01 mólos ecetsav-oldat hozzáadásával. Az oldatot 0,2 µM-es szűrőn megsűrjük, majd rátöltjük egy 0,8 liter térfogatú S-Sepharose oszlopra, amit előzőleg 0,13 mól nátrium-kloridot tartalmazó 20 mmólos ecetsav-oldattal (pH=5) ekvilibrálnuk: a fehérje/gyanta arány 4,7 mg/ml. Az oszlopot először 2,4 liter ekvibrációs pufferrel mossuk, majd lineárisan emelkedő nátrium-klorid gradienssel eluáljuk (a gradienst 5,6 liter 20 mmólos, 0,13 mól nátrium-kloridot tartalmazó és 5,6 liter, 20 mmólos, 0,5 mól nátrium-kloridot tartalmazó, 5 pH-jú ecetsav-oldatból állítjuk elő). A frakciókat gélelektroforézissel ellenőrizzük, a GM-CSF-et tartalmazókat egyesítjük és azzal megismételjük a 2. lépést.

#### 3. lépés: Ammónium-szulfátos kicsapás

A 2. lépésben kapott egyesített oldathoz (2,4 liter) 351 g/l ammónium-szulfátot adunk (55%-os telítés). Az oldatot 2 órán át 4 °C hőmérsékleten állni hagyjuk, majd ugyancsak 4 °C-on 30 percig centrifugáljuk 4500 fordulatszámon.

#### 4. lépés: Gélszűrés

A 3. lépésben kapott csapadékot 36 ml, 18 mmól nátrium-foszfát/2 mmól citromsav pufferben (pH=7,2)

feloldjuk, az oldatot 30 percig 4500 fordulatszámon centrifugáljuk, majd 0,2 µM-es szűrőn szűrjük. A tiszta oldatot rátöltjük egy 1,8 liter térfogatú Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) oszlopra, amit előzőleg a fenti pufferrel lekvilibrálnuk: a fehérje/gél arány 0,21 mg/ml. Az oszlopot 1,9 liter fenti pufferrel eluáljuk; a megfelelő frakciókat a fehérjetartalom mérésével választjuk ki.

#### 5. lépés: Utótisztítás

A 4. lépés egyesített frakcióit 0,2 µM-es szűrőn szűrjük és -20 °C hőmérsékleten tároljuk. A GM-CSF 95-99%-os tisztaságú; a kitermelés: 32%.

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás GM-CSF elválasztására GM-CSF-et és szennyező fehérjéket tartalmazó nyers fehérje-preparátumokból ioncserélő kromatográfiával, *azzal jellemezve*, hogy a keverék vagy egy anioncserélő gyantán (vagy anioncserélő kromatográfiával) előtisztított keverék pH-ját a kívánt fehérje és a szennyezések előre meghatározott izoelektromos pontjai közötti értékre állítjuk be, ezen a pH-n egy erős kationcserélő gyantán kromatografáljuk a keveréket, a gyantához kötött kívánt fehérjét eluáljuk, kicsapjuk, gélszűréssel továbbtisztítjuk, és kívánt esetben az egyes lépéseket egyszer vagy többször megismételjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy anioncserélőként kvaterner aminos-funkciós csoportokat tartalmazó gyantát használunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kationcserélőként szulfonát-funkciós csoportokat tartalmazó gyantát használunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az izoelektromos pont meghatározását számítógépes szimulációval vagy izoelektromos fókuszálással végezzük.

5. Az 1. igénypont szerint eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kívánt fehérjét ammónium-szulfáttal csapjuk ki.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás GM-CSF elválasztására GM-CSF fehérjét és delta-4 GM-CSF-et tartalmazó, rekombináns úton nyert fehérje-keverékből, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket először kvaterner aminos-funkciós csoportokat hordozó anioncserélő gyantán előtisztítjuk, majd a pH értéket 5,0-re beállítjuk, szulfonát-funkciós csoportokat hordozó kationcserélő gyantán kromatografáljuk, ammónium-szulfáttal kicsapjuk, és gélszűréssel tisztítjuk.