

3020/95

Közzétételi
kezelés

13437/3320

61.235/SZE

KIVONAT

Eljárás polipeptid jelenlétének kimutatására és átalakítására

Novo Nordisk A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

A bejelentés napja: 1994. 04. 19.

Elsőbbsége: 1993. 04. 20. (0445/93)

DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK94/00157

~~A nemzetközi közzététel száma: WO 94/24157~~

~~A találmány tárgya~~ Eljárás egy növekedési hormon hidrofób származékának a növekedési hormon natív formájává való konvertálására, valamint egy növekedési hormon hidrofób származéka jelenlétének detektálására szolgáló módszer.

~~A találmány szerint~~ Az eljárást az jellemzi, hogy a növekedési hormon származékát egy merkaptó vegyülettel kezeljük, valamint a növekedési hormon származéka egy extra kénatomot tartalmaz a natív növekedési hormonhoz viszonyítva, és a növekedési hormont egy hidrofób interakciós kromatográfiának vetjük alá és az oszlopot egy só gradiensével eluáljuk és a hidrofób származék jelenlétét detektáljuk.

Helhelyi Eva

302/95

61.235/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Közzététel 
példány

Eljárás polipeptid jelenlétének kimutatására és átalakítására

Novo Nordisk A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

Feltalálók: SORENSEN Hans Holmegaard, VIRUM,

CHRISTENSEN Thorkild,

ALLEROD,

DÁNIA

A bejelentés napja: 1994. 04. 19.

Elsőbbsége: 1993. 04. 20. (0445/93)

DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK94/00157

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/24157

A találmány területe

A jelen találmány egy növekedési hormon hidrofób származéka jelenlétének detektálására szolgáló módszerrel, valamint a származék a növekedési hormon natív formájává való konvertálására szolgáló módszerrel kapcsolatos.

A találmány háttere

Az emberből és a közönséges háziállatokból származó növekedési hormonok megközelítően 191 aminosavból álló proteinek, melyeket a hipofízis elülő lebenye szintetizál és szekretál. A humán növekedési hormon 191 aminosavból áll, molekulásúlya 22125 D. Négy cisztein maradék található benne, melyek jelenléte 2 diszulfid híd kötést eredményez. Az 53-as és a 165-ös pozícióknál található ciszteinek közötti diszulfid híd eredményezi a fő hurkot és a 182-es és a 189-es pozícióban található ciszteinek közötti diszulfid híd egy kisebb hurkot képez.

A növekedési hormon egy olyan kulcs hormon, mely nemcsak a szomatikus növekedés szabályozásában vesz részt, hanem a proteinek, szénhidrátok és a lipidek metabolizmusának szabályozásában is.

A növekedési hormon hatása alatt álló szerv rendszerek közé közé tartoznak a csontváz, a kötőszövet, az izomzat és a zsigerek, mint pl. a máj, a bélrendszer és a vesék.

A rekombináns technológia és a növekedési hormon gén klónozásának kifejlesztéséig - mely most pl. a humán növekedési hormon (hGH) és a Met-hGH ipari méterű termeléséhez vezetett - a humán növekedési hormont csupán humán holttestek hipofíziséből lehetett kinyerni.

A növekedési hormon nagyon korlátozott mennyisége ennek használatát a gyermekkori és serdülőkori longitudinális növekedés serkentésére korlátozta a törpeség kezelésére, bár javasolták a kis termet (a növekedési hormon deficiencia következtében fellépő, a normális kis termet és a Turner szindróma) a felnőttkori növekedési hormon deficiencia, a terméketlenség, az égési sérülések, a sérülések, a dystrophia, a csont összeforrás, az osteoporosis, a diffúz gyomor vérzés és a pseudoarthrosis kezelésére.

Továbbá, a növekedési hormon használatát javasolták a háziállatok növekedési sebességének növelésére, az emberi fogyasztásra szánt állatok zsír mennyiségének csökkentésére, valamint a tejelő állatok tejtermelésének fokozására.

A rekombináns technikákban a humán növekedési hormont normálisan a humán növekedési hormont kódoló gén expresszáásával termelik, az említett gén egy mikroorganizmusba való inzertálásán keresztül. Ezután a növekedési hormont a táplevessből izolálják, lehetőleg a mikroorganizmusok lizálása után. A hGH expresszáására leggyakrabban használt gazda az *E. coli*.

A hipofízisből kivont, vagy a rekombináns technikával előállított növekedési hormont mindig megfelelő standardekkel hasonlítják össze egy autentikus termékkel való azonosság biztosítása céljából.

A hipofízisből kivont hGH-t vizsgálat alá vetették az aberráns formák detektálása céljából, valamint ezek specifikus aktivitásának meghatározásához. A fent említett molekulásúlyú növekedési hormonon túl számos egyláncú forma is termelődik, ahol a 32-46 aminosav maradékok hiányoznak. Ezek az úgynevezett 20 k fomájú hGH-k. Ez a variáns az eredménye az mRNS szinten történő váltakozó hasításnak is. A hipofízisből izolált hGH készítményekről azt írták, hogy tartalmazznak tömeg, töltés, elrendeződési, és oxidált variánsokat, valamint hasítási variánsokat is. Az új vizsgálatok kifejlesztése lehetővé tette a készítményekben és a standardekben nagyon kis mennyiségekben levő növekedési hormon származékok jelenlétének detektálását. Így egy ezideig ismeretlen hidrofób, szennyeződés került detektálásra a humán növekedési hormon készítmények tisztításával kapcsolatban, Hidrofób Interaction Kromatográfiát (HIC) használva speciális közülmények között. Ezt a származék normális esetben nem kerül detektálásra a humán növekedési hormon minták tesztelésére használt semmilyen más módszerrel (ideértve az SDS-PAGE, RP-

-HPLC, IE-HPLC és GPC módszereket vagy a más körülmények között végzett HIC módszert).

A gyógyszerészeti készítmények előállításához általában előnyben részesül a lehető legtisztább formában levő aktív alkotórészek alkalmazása és ha lehetséges előnyben részesül a monokomponensű vegyületek formájában levő aktív alkotórészek alkalmazása.

Kívánatos egy olyan módszer kifejlesztése, mellyel könnyen lehet detektálni az itt leírt növekedési hormon hidrofób származékait, valamint szükség van a növekedési hormon tételekből a származékok eltávolítására szolgáló módszerre.

Lehetőség van a hidrofób származékok fizikai szeparációs technikákkal való eltávolítására. Azonban egy ilyen eljárás magában kevésbé kívánatos az aktív alkotórészek mennyiségi vesztesége miatt.

Így szükség van egy olyan eljárásra is, mely biztosítja a növekedési hormon hidrofób származékainak natív terméké váló kvantitatív konverzióját.

A találmány rövid leírása

Azt találtuk, hogy a találmányban leírt humán növekedési hormon hidrofób származéka könnyen detektálható kromatográfiás módszerekkel és könnyen konvertálható a humán növekedési hormon natív formájává.

Így egy első aspektusban, a találmány egy növekedési hormon egy hidrofób származéka jelenlétének detektálására szolgáló módszerrel kapcsolatos, mely hidrofób származék egy extra kénatomot tartalmaz a natív növekedési hormonhoz viszonyítva, és ahol a növekedési hormont egy hidrofób interakciós kromatográfiának vetjük alá, melynek során az oszlopot ammónium szulfát grádiensével eluáljuk és a hidrofób származék jelenlétét detektáljuk.

A hidrofób interakciós kromatográfia az LC & GC.INTL-ben került leírásra (Vol 5, No. 11 (1992) 14-29).

A HIC egy fenil szuperóz oszlop FPLC készülékben való használatával végezhető el. A megfelelő készülék az FPLC készülék Fenil Szuperóz HR 5/5, melyet a Pharmaciától lehet beszerezni.

Az eluálás megfelelő sókkal végezhető el, mint amilyen az ammónium szulfátok és/vagy az ammónium acetát.

A növekedési hormon hidrofób származékait tartalmazó HIC-ből származó eluátumok frakciói ezután peptid térképezésnek vethetők alá, a leírtaknak megfelelően (High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology Ed. William S. Hancock, John Wiley & Sons Inc., 1990, Chapter 9.).

A növekedési hormon hidrofób származéka detektálható a retenciós idők összehasonlításával, mivel a triszulfid hidat tartalmazó fragment retenciós ideje hosszabb, mint a diszulfid hidat tartalmazó megfelelő fragmenté.

Egy további aspektusban, a jelen találmány egy növekedési hormon hidrofób származékának a növekedési hormon natív formává való konvertálására szolgáló módszerrel kapcsolatos.

Meglepően azt találtuk, hogy a növekedési hormon hidrofób származéka a növekedési hormon natív formájává egy merkaptó vegyülettel való kezeléssel alakítható. A kezelést kényelmesen oldatban végezhetjük el, melyben a humán növekedési hormon hidrofób származéka egy oldószerben van.

Azt találtuk, hogy az ilyen hidrofób származékok közvetlenül a natív formává konvertálhatók egy merkaptó vegyületet használó enyhe kezeléssel. Így a konverzió vagy a "újra hajtogatás" a találmány szerint elvégezhető a proteinek újra hajtogatásához való hagyományos pufferrel, de a proteinek újrashajtogatásakor normálisan

várható diszulfid hidak törésére szolgáló megelőző redukciós vagy denaturációs lépés nélkül.

A találmány egy további aspektusa szerint a hGH hidrofób származékát a natív hGH-vá való konverzió végrehajtása előtt izoláljuk.

Előnyben részesítjük a növekedési hormon hidrofób származékát tartalmazó teljes növekedési hormon tétel közvetlen kezelését a növekedési hormon származék izolálása nélkül.

A merkaptó vegyület lehet bármely merkaptó vegyület, mely nincs káros hatással a növekedési hormonra a reakció körülmények között. Az előnyben részesített vegyületek az olyan vegyületek, melyek képesek a növekedési hormon származék közvetlen natív formává való transzformálására, a növekedési hormon redukálása - a natív növekedési hormonban jelenlevő mindkét diszulfid hid teljes széttörésével - nélkül. A merkaptó vegyület lehet pl. cisztein, glutation, 2-merkaptó-etanol vagy ditionitritol (DTT). Az előnyben részesített vegyületeket a ciszteint és a glutationt tartalmazó csoportból szelektáljuk. Leginkább a ciszteint részesítjük előnyben.

Normálisan a merkaptó vegyület oldatban van 0,1 - 5 mM koncentrációban. Előnyösen a koncentráció a 0,5 - 3 mM határok közé esik. A találmány előnyben részesített aspektusa szerint a növekedési hormont 1 - 2 mM koncentrációban levő ciszteinnel kezeljük.

A találmány szerinti használatban a "növekedési hormon" kifejezés olyan növekedési hormont jelent, mely madárból, szarvasmarhából, lóból, emberből, juhból, disznóból, lazacból, pisztrángból vagy tonhalból származó növekedési hormon, előnyösen szarvasmarha, humán, vagy disznó növekedési hormon, leginkább a humán növekedési hormon részesül előnyben. A kezelendő növekedési hormon a jelen találmánnyal összhangban lehet egy természetes forrásból izolált növekedési hormon, pl. egy hagyományos módszerrel a hipofízisből kivont növekedési hormon, vagy egy

rekombináns technikával előállított növekedési hormon (pl. E.B. Jensen and S. Carlsen Biotech and Bioeng. 36, 1-11, 1990). Az előnyben részesített növekedési hormon a humán növekedési hormon.

A "növekedési hormon" lehet a növekedési hormon egy csonkított formája, ahol egy vagy több aminosav maradékot vetettünk alá delécióknak; ezek egy analógja, ahol a natív molekulában egy vagy több aminosav maradékot helyettesítettünk más aminosav maradékkal, előnyösen egy természetes aminosav maradékkal, amennyiben a helyettesítés nincs káros hatással, pl. antigenitás, vagy csökkent hatás; vagy ezek egy származéka, pl. rendelkezhet egy N- vagy C-terminális extenzióval mint pl. Met-hGH, Met-Lys-hGH, Ala-Glu-hGH, Thr-Glu-Ala-Glu-hGH, Ala-Glu-Ala-Glu-hGH, Met-Glu-Ala-Glu-hGH, Met-Phe-Glu-Glu-hGH, Met-Asp-Ala-Asp-hGH, vagy Met-Glu-Ala-Asp-hGH.

A kezelendő növekedési hormon származéka oldatának előállításához használt oldószer lehet például egy vizes puffer, mely a pH értéket 5-10 közé pufferolja. A 6-os pH értéknél nagyobbra pufferolt oldatokat részesítjük előnyben. Az oldószert előnyösen a Tris, trietilamint, citromsavat foszfát puffert és hisztidint magába foglaló csoportból szelektáljuk. Tris az előnyben részesített puffer.

Az előnyben részesített pufferolt oldatot pH 7,5 értékre pufferoljuk 20 mM Tris és 10 mM citromsavat használva.

A találmány részletes leírása

A humán növekedési hormon hidrofób variánsa aminosav szekvenciájának a humán növekedési hormon aminosav szekvenciájával való aminosav szekvencia azonosságát az izolált peptid fragmentek triptines peptid térképezésével, aminosav szekvencia analízissel határozzuk meg. Továbbá tömeg spektrometriás vizsgálatot is elvégeztünk.

A tömeg spektrometria a hGH hidrofób származékának 32 daltonos tömeg növekedését mutatta a natív hGH-hoz viszonyítva. Ez az extra kénatom jelenlétének tulajdonítható.

A hidrofób növekedési hormon származék jellemzésének eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a származék egy olyan humán növekedési hormon, mely egy diszulfid hiddal (Cys 53-Cys 165) és egy triszulfid hiddal (Cys 182-S-Cys 189) rendelkezik, valamint aminosav szekvenciája azonos a natív hGH-éval.

KÍSÉRLETI RÉSZ

1. példa

A humán növekedési hormon hidrofób származékának detektálása

A rekombináns humán növekedési hormon hidrofób származéka - mely egy extra kénatommal rendelkezik a növekedési hormon natív formájához képest - jelenlétét a találmánnyal összhangban detektáljuk úgy, hogy a növekedési hormont HIC-nek vetjük alá egy FPLC készüléket (Pharmacia) és Fenil Szuperóz HR 5/5 (Pharmacia) készüléket használva.

Az eluáláshoz ammónium szulfát gradiensét használjuk.

A puffer rendszer a következő:

A puffer: 1,2 ; ammónium szulfát, 20 mM tris pH=7,4

B puffer: 20 mM Tris pH=7,4

Az összes használt vegyszer Merk vegyszer.

Az eluálást a következő grádienseket használva végezzük:

Idő (perc)	Puffer
0,0	Konc. %B 0,0
1,0	Konc. %B 0,0
10,0	Konc. %B 100
16,0	Konc. %B 100
17,0	Konc. %B 0
22,0	vége

A puffert 0,50 ml/perc rátával adjuk és a papír adagolási sebessége 0,50 cm/perc.

A hidrofób származékot tartalmazó eluátum frakcióit a fent leírtak szerint peptid térképezésnek vetjük alá.

A humán növekedési hormon hidrofób származékának detektálására szolgáló alternatív módszer

A hGH mintákat egy TSK Éter 5PW (75 x 4,6 mm ID) oszlopon analizáljuk környezeti hőmérsékleten C és D eluenseket használva és a D eluens 40-50 % grádiensét használva 30 percen keresztül.

C eluens: 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pH=6,0

D eluens: 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 % PEG, pH=6,0

A detektálás 280 nm hullámhosszon történik. Az átfolyás 0,5 ml/perc. HPLC készülék: Adat kezelés és szabályozás: Waters 860 Networking számítógép rendszer, Pumpák: Waters pumpák 510-es modell, Minta injektorok: Waters Wisp 712, Detektor: Waters M481 spektrométer.

A rekombináns humán növekedési hormon (rhGH') hidrofób származékát a 8-as és 9-es csúcsok között megjelenő új csúccsal valamint az ezzel egyidőben észlelhető 7-es csúcs (a 7-es peptid) - mely megfelel a 179-191 aminosav maradékoknak a rekombináns humán növekedési hormon (rhGH) peptid térképében - eltűnésé-

vel azonosítjuk. A csúcsok számozása megfelel az irodalomban leírtaknak (High Performance Liquid Chromatography Chapter 9, supra).

A humán növekedési hormon hidrofób származékának izolálása

Ha egy hGH mintából a hidrofób származék izolálása kívánatos, az ilyen izolálás végrehajtható a fent leírt eljárás léptéknövelésével, vagy végrehajtható az irodalomban leírt eljárást használva (Bio/Technology 5 161-164 (1987)).

A humán növekedési hormon hidrofób származékának tömeg spektroszkópiás jellemzése

A rekombináns humán növekedési hormont sorrendben Plazma Deszopciós Tömeg Spektroszkópiával (PDMS) és Elektro-Spray Tömeg Spektroszkópiával (ESMS) analizáljuk.

Az analízis során sorrendben az intakt rhGH és rhGH' és a megfelelő 7 és 7' triptikus peptidek közötti eltérés detektálására fektetjük a hangsúlyt.

Az intakt rhGH és rhGH' tömeg meghatározása

Az intakt rhGH és rhGH' tömegét ESMS-t használva határozzuk meg API III LC/MS rendszert (Sciex. Thornhill, Ontario, Canada) használva. A hármass "quadropole" készülék 2400 tömeg-töltés (m/Z) határral rendelkezik és egy pneumatikus meghajtású elektroprayhez (ionsprayként is utalnak rá) interface-hez illeszkedik (P1, P1). A minta bejuttatását egy injekcióstű infúziós pumpával (Sage Instruments, Cambridge, MA) érjük el egy fuzionált kapillárison keresztül (75 µm i.d.) a folyadék áramlást 0,5 - 1 µl/perc értékre állítjuk. A készülék m/z skáláját poli(propilén glikolok)(PPG-k) egyszeres töltésű ammónium addukt ionjaival kalibráljuk egység felbontás mellett. A tömeg meghatározás pontossága általában 0,02 %-

nál jobb, de a kis intenzitású spektrum kevésbé pontos tömeg meghatározást eredményezhet.

A Plazma Deszoprciós Tömeg Spektrometria (PDMS) analízist egy BIO-ION 20K 252-California "time-of-flight" készülékkel (ABI Nordic A/s, Uppsala, Sweden) használva végezzük el. A minta adagoláshoz standard eljárást (ideértve az in situ redukciót, DTT-t használva) és analízist hajtunk végre (P3, P4). A tömeg meghatározás pontossága kb. 0,1 %.

Az analízis előtt az rhGH-t és az rhGH'-t is sómentesítjük egy Sep-pak készüléken (Stacioner fázis C₁₈ a Waterstől). Az rhGH' 31±2 amu tömegnövekedést mutat az rhGH-hoz viszonyítva. A DTT-t használó redukció után az rhGH' tömege meg-
egyezik a redukált rhGH számított tömegével.

Az eredményeket az I. táblázat mutatja

	I. táblázat	
	ESMS	Számított
rhGH	22126±2	22125,2
rhGH"	22157±2	-
rhGH" + DTT	22129±2	-

Az rhGH és rhGH' 7-es számú triptikus fragmentjének tömeg meghatározása

Az rhGH és rhGH' 7-es számú triptikus fragmentjének, a 7-es és 7' fragmenteknek, a tömegét PDMS-sel határozzuk meg. A 7-es fragment az rhGH triptikus peptid térképezéséből származik.

1 mg/ml koncentrációban levő hGH-t dializálunk 50 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 6H₂O (pH=7,8) elegyével szemben 24 óráig 4 °C hőmérsékleten. A hGH-hoz mg

mennyiségenként 10 µl tripszin oldatot (1 mg tripszin/ml feloldásával (szarvasmarha, DPCC kezelt, T-1005 a Sigmától) nyerjük), 1 mM HCl-t, 2 mM CaCl₂*6H₂O-t adunk hozzá. Az emésztést 6 órán keresztül hajtjuk végre 37 °C hőmérsékleten. Az emésztési terméket (25 µl) analizáljuk a következőket használva RP-HPLC: Oszlop: Nucleosil RP C18, 250 x 4 mm, 120 Å, 7µ (Macherey-Nagel, Art 720042); a hőmérséklet: 45 °C; detektálás: 215 nm hullámhosszon; átfolyás: 1 ml/perc; E eluens: 0,05 % (térf/térf) TFA vízben; F eluens: 0,05 % (térf/térf) TFA 70 %-os vízben levő acetonitrilben; grádiens: 0 - 70 F eluens 60 perc alatt. Ezután a grádiens 100 % F eluensre cseréljük 5 perc alatt, amit 10 percig tartó izokratikus eluálás követ 100 % F- fel. A grádiens visszaállítjuk 0 % F-re 1 perc alatt és az oszlopot 15 percig ekvilibráljuk a következő futtatás előtt.

A triptikus hasítással létrehozott rhGH 7-es fragmentjének számított tömege 1401 és az I-es szerkezeti képlettel rendelkezik: I-es szerkezeti képlet

Ile-Val-Gln-Cys-Arg

|

S

|

S

|

Ser-Val-Glu-Ser-Cys-Gly-Phe Mr: 1401

Egy 32 amu különbséget észlelünk a 7-es és 7' peptidek tömege között. DTT-t használó redukció után azonos tömegeket kapunk a 7-es és a 7' peptidek esetében, melyek megfelelnek a redukált peptid számított tömegének. Az eredményeket a II. táblázat mutatja:

II. táblázat

	PDMS	Számított
7' fragment	1401	1401
7" fragment + DTT	617 + 785	618 + 785
7" fragment	1433	
7" fragment + DTT	617 + 785	

A 7' fragmentet a fent leírt tripszin emésztés RP-HPLC-vel kapott új csúcsának megfelelő frakció összegyűjtésével izoláljuk.

A részleges Edman Degradációt, a PDMS analízissel valamint az ESMS analízissel együtt a 7' fragmenten közvetlenül hajtjuk végre. Négy lépésen keresztül nyomon lehet követni a manuális degradációt (lebomlás) a csonkított peptid analízálásával. Az egyes lépésekben két aminosav maradékot hasítunk le (egyét az egyes N-terminálisokról). A 7-es és 7' peptidek közötti 32 amu tömeg eltérés nem változik a négy hasítási lépés során.

Az ESMS-sel végzett MS/MS analízis egy sor ionizált szekvenciát eredményez, melyek a peptid N-terminális részével kapcsolatosak. Az MS/MS-t a 7' peptid - mely 717 amu tömegű és egy kettős töltéssel rendelkezik - molekuláris ionját használva hajtjuk végre. A "felső lánc" fragmentálása a következő értékeknél ad csúcsokat: m/z: 1320, 1221 és 1094, míg az "alsó lánc" fragmentálása a következő értékeknél ad csúcsokat: m/z: 1247, 1118, 1061 és 974. A következtetés szerint az első négy aminosav maradék az egyes "láncokban" - legalábbis a cisztein maradékot tekintve - normál tömeget mutat

Igy az rhGH és az rhGH' közötti 32 amu tömeg eltérés úgy tűnik egy triszulfid jelenlétének tulajdonítható a normál diszulfiddal szembeállítva.

A hGH'-ban levő extra kénatom jelenlétének bemutatása

A triszulfid hid jelenlétét ólom acetátot használva mutatjuk ki az alábbiakban leírtak szerint.

Az alábbiakban leírtak szerint ciszteinnel való rhGH' kezelés azt mutatja, hogy az rhGH' natív rhGH-ná transzformálódik, melynek során hidrogén szulfid képződést detektálunk.

Szűrőpapírt (Watman üveg mikrorostú szűrők) merítünk 0,1 M ólom acetát desztillált vizes oldatába majd levegőn megszárítjuk.

Hat kémcsövet készítünk, melyek tartalma a III. táblázatban leírtak szerinti.

III. táblázat

2 db	10 ml	víz
2 db	10 ml	tiszta hGH"-t
2 db	10 ml	7"-es csúcs nélküli hGH

A teszt kémcsöveket két sorozatra osztjuk a IV. táblázatban megadottak szerint.

IV. táblázat

I-es sorozat		II-es sorozat	
kémcső	tartalma	kémcső	tartalma
1	víz	4	víz
2	tiszta hGH"	5	tiszta hGH"
3	hGH (7" csúcs nélkül)	6	hGH 7" csúcs nélkül)

Az I-es sorozat minden kémcsövéhez 2,5 ml desztillált vizet adunk.

A II-es sorozat minden kémcsövéhez 2,5 ml 2,5 mM desztillált vízben levő ciszteint adunk.

A szűrőpapírt hat részre vágjuk (3,5 cm átmérőjű rondók) és a nyolc teszt kémcső tetejére helyezzük. A rondókat 3-4 csepp desztillált vízzel megnedvesítjük és a teszt kémcsöveket a 40 °C hőmérsékletű vízfürdőben hagyjuk 24 órán keresztül.

A 24 óra elteltével a papír rondókat megvizsgáljuk. A hozzáadott vizet tartalmazó teszt kémcső esetében nem észlelünk változást.

A 4 és 6 teszt kémcsövek (melyekhez ciszteint adtunk) tetején levő papírok nagyon gyenge barnás elszíneződést mutatnak. Az 5. teszt kémcsővön levő papíron egy tömött fekete pont látható mely az ólom szulfid képződésnek tulajdonítható. A fekete folt 10-15 perc elteltével jelenik meg.

2. példa

A humán növekedési hormon hidrofób származékának natív humán növekedési hormonná való konverziója

rhGH'-t tartalmazó mintából liofilizált rhGH-t kezelünk a következők szerint, a hGH hidrofób származékának natív hGH-vá való konvertálása céljából.

- A: 4 IU hGH-t oldunk fel 2,5 ml desztillált vízben.
- B: 4 IU hGH-t oldunk fel 2,5 ml desztillált vízben, melyet 10 percig tartó szobahőmérsékleten 100 µl merkaptó etanollal végzett redukció követ. Ezután a kapott elegyet sómentesítjük PD10-et (Pharmacia, Sephadex G 25) használva 20 mM Trisbe (pH=8,6). Az oldatot 2 órán keresztül 4 °C hőmérsékleten hagyjuk és hidrofób interakciós kromatográfiával analizáljuk az 1. példában leírtak szerint.
- C: 4 IU hGH-t oldunk fel 2,5 ml 20 mM Trisben (pH=8,6). Az oldatot 2 órán keresztül 4 °C hőmérsékleten hagyjuk és az 1. példában leírtak szerint hidrofób interakciós kromatográfiával analizáljuk.

D: 12 IU hGH-t oldunk fel 7,5 ml újra hajtogatási pufferben a WO 92/03477 szabadalomban leírtak szerint: 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM Cisztein. Az oldatot 2 órán keresztül 4 °C hőmérsékleten hagyjuk és az 1. példában leírtak szerint hidrofób interakciós kromatográfiával analizáljuk. A mintát ezután sómentesítjük 2 mM His-szé (pH=6,5) az 1. példában leírtak szerint hidrofób interakciós kromatográfiával analizáljuk.

Az eredmények azt mutatják, hogy a hajtogatási pufferben (D minta) - mely gyengén redukáló, azonban hatékony diszulfid képződést biztosít - való újra feloldás az rhGH' natív rhGH-ná való transzformációját okozza.

A vízben vagy Trisben (pH=8,5) történő újra feloldás nem okoz konverziót (A és C minta). Ha az rhGH'-t merkaptó etanollal teljesen redukáljuk az E. coli sejtekben található formával azonos hGH formát kapva (de hidrogén diszulfid jelenléte nélkül a tápközegben) a homogenizálás előtt, helyes hajtogatás kaphatunk Trisben (pH= 8,5) a cisztein hozzáadása (B minta) nélkül. Ahogy azt fenn bemutattuk, az rhGH' 2 mM cisztein jelenlétében natív hGH-vá transzformálható. Ha az rhGH-t egy DAP1-gyel hasítandó amino terminális extenzióval rendelkező prekursoraként expresszáljuk a hasítás elvégezhető ciszteint tartalmazó tápközegben, mely elősegíti a helyes diszulfid hidakkal rendelkező natív termék képződését.

Ebben az esetben a konverzió és a hasítás megfelelően két lépésben megy végbe, először magas pH értéken a hidrofób származék konvertálásához, mely után a pH értéket lecsökkentjük az amino terminális extenzió hasításának megvalósításához. A klór ionokat tartalmazó 20 mM Trisben (pH=7,5) levő rhGH normális tisztításában az első tisztítási lépésből származó eluátum 4,5 ml mennyiségéhez 10 mM citromsavat adunk 4 °C hőmérsékleten és 0,5 ml 20 mM desztillált vízben levő cisztein oldatot.

Ezután 1,2,4,8,16,32 és 64 perc elteltével a gyártók utasításának megfelelően NAP-5 oszlopon (Pharmacia) sómentesített mintákat 25 mM Trissel eluálva kinyerjük. Az eluálás után a pH értéket 7,5-re állítjuk és a 7' peptid tartalmat az 1. példában leírtak szerint hidrofób interakciós kromatográfiával analizáljuk. Egy perc után a 7' proteinnek megfelelő csúcs kb. 75 %-kal csökkent és 4 perc után a csúcs teljesen el is tűnt. Így a 7' protein valószínűleg natív proteinné konvertálódik a 2 mM ciszteinnel 4 percig tartó kezelés hatására (4 °C hőmérsékleten).

Ezután a pH értéket 4-4,5-re állítjuk az esetleg jelenlevő extenzió lehasítása céljából.

3. példa

A humán növekedési hormon hidrofób származékának natív humán növekedési hormonná történő konverziója

A hajtogatási kísérleteket 2 mM cisztein koncentrációval végezzük el különböző pH értékek mellett (4,3, 6,0, 7,5). Kiindulási anyagként hGH'-t tartalmazó hGH-t használunk. A kiindulási anyag (0,7 mg/ml koncentráció) 1 ml mennyiségét a kiválasztott pH értékre állítjuk, majd 1 ml 4 mM-os EDTA-val, 4 mM Cys-nel, 40 mM Trissel, 20 mM citrosavval keverjük össze. Különböző intervallumokban a mintákat leengedjük és azonnal sómentesítjük NAP-5 oszlopon (Pharmacia) 20 mM Trissel szemben, 10 mM citromsavval állítjuk a pH értéket a fenti válsztott értékre. A HIC analízist az 1. példában leírt első említett rendszert használva végezzük el.

A környezeti hőmérsékleten elvégzett kísérletek eredményei a következők:

A kiindulási anyag hGH' tartalma 8%. 4,3 pH értéken a hGH' tartalom 4 perc után 7,7 %-ra csökken, és az egy éjszakán át állni hagyott minta hGH' tartalma még mindig 6 %.

6,0 pH értéken a hGH' tartalom 4 perc elteltével 6,0 %-ra csökken, és 64 perc után 1,7 %-ra. 20 óra elteltével nem észlelünk hGH'-t.

7,5 pH értéken a hGH' tartalom nagyon gyorsan csökken. 1 perc után 2,6 %-ra, 2 perc után 1,6 %-ra csökken és 4 perc után már nem lehet hGH'-t detektálni.

A 4 °C hőmérsékleten és 7,3 pH értéken végrehajtott konverzió eredménye a következő:

2 perc után a hGH' tartalom 2,5 %-ra csökken, 4 perc után 1 %-ra és 8 perc után nem lehet hGH'-t detektálni.

Ez azt mutatja, hogy a konverzió gyorsan és mennyiségi szempontból detektálhatóan megy végbe pH=7,5 értéken, alacsonyabb pH értéken sokkal lassabban és nem is teljes a konverzió.

A hőmérséklet hatása elhanyagolható.

SZEKVENCIA LISTA

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ

(i) FELTALÁLÓ:

- (A) NÉV: Novo Nordisk A/S
- (B) UTCA: Novo Alle
- (C) VÁROS: DK-2880 Bagsvaerd
- (E) ORSZÁG: Dánia
- (G) TELEFON: +45 44448888
- (H) TELEFAX: +45 44490555
- (I) TELEX: 37173

(ii) A TALÁLTMÁNY CÍME:

Eljárás polipeptid jelenlétének kimutatására és átalakítására

(iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 2

(iv) SZÁMÍTÓGÉPES OLVASÁSI FORMA:

- (A) A HORDOZÓ TÍPUSA: Floppy disk
- (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC kompatibilis
- (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, 1,25 # verzió (EPO)

(v) JELEN ALKALMAZÁS ADATAI:

ALKALMAZÁSI SZÁM:

(vi) ELSŐBBSÉGI ADATOK:

(A) ALKALMAZÁSI SZÁM: DK 0445/93

(B) IKTATÁSI DÁTUM: 1993. április 20.

(2) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 5 aminosav (B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTI-SENSE: nincs

(v) FRAGMENT TÍPUS: belső

(xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ile Val Gln Cys Arg

1

5

(2) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 7 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Val Glu Ser Cys Gly Phe

1

5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy növekedési hormon hidrofób származékának a növekedési hormon natív formájává való konvertálására, azzal jellemezve, hogy a növekedési hormon származékát egy merkaptó vegyülettel kezeljük.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a merkaptó vegyület a ciszteint és glutationt, 2-merkaptó etanolt és ditiotreitolt tartalmazó csoportból szelektáljuk.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a merkaptó vegyület a cisztein jelenti.
4. Az 1-3. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a merkaptó vegyület koncentrációja 5 mM értékig terjed.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a merkaptó vegyület cisztein és koncentrációja 1 - 2 mM értékek közé esik.
6. Az 1-5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a növekedési hormont a humán növekedési hormon képviseli.
7. Egy növekedési hormon hidrofób származéka jelenlétének detektálására szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy a növekedési hormon származéka egy extra kénatomot tartalmaz a natív növekedési hormonhoz viszonyítva, és a növekedési hormont egy hidrofób interakciós kromatográfiának vetjük alá és az oszlopot egy só gradiensével eluáljuk és a hidrofób származék jelenlétét detektáljuk.

22 oldal nagy felület
Melléklet Éva

A meghatalmazott

Dr. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 173.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323