

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

212 929 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 02251
(22) A bejelentés napja: 1990. 01. 08.
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/00141
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/10730

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 9/22

(40) A közzététel napja: 1994. 06. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1996. 12. 30.

(72) Feltalálók:

Herrmann, Peter, Itingen (CH)
Klein, Peter, Itingen (CH)

(73) Szabadalmas:

Nika Health Products Ltd., Vaduz (LI)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Eljárás ribonukleáz dimerek előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás ribonukleáz dimer előállítására, melynek során

a) ribonukleáz oldatot állítanak elő úgy, hogy ribonukleáz monomereket adagolnak egy legalább 9-es pH-értékű puffer oldathoz,

b) egy parafaimidát kapcsolóreagenst adagolnak a ribonukleáz oldathoz, és a ribonukleáz monomereket dimerizálják, miközben a reakcióelegy pH-értékét nem engedik 9 alá csökkenni.

c) a dimerizációs reakciót egy adott ponton leállítják,

d) a kapott dimerizált ribonukleázt folyadékkromatográfiásan tisztítják, oly módon, hogy a c) lépésben a dimerizációs reakciót úgy állítják le, hogy sav adago-

lásával az oldat pH-értékét $7 \pm 0,2$ -re csökkentik, a kapott oldatot töményítik, majd a d) tisztítási lépésben két folyadékkromatográfiás tisztítási lépést alkalmaznak, ahol az első tisztítási lépésben kapott, fő tömegében ribonukleáz dimert tartalmazó frakciót töményítés után vezetnek a második tisztítási lépésbe; és

kívánt esetben a kapott ribonukleáz dimert sómentesítik a második kromatográfiás tisztítási lépés előtt vagy után, és

kívánt esetben a kapott ribonukleáz dimerből eltávolítják az endotoxinokat, és

kívánt esetben a tisztítás során kapott ribonukleáz monomereket tartalmazó frakciókat visszavezetik a b) lépésbe.

Jelen találmány tárgyát ribonukleáz dimerek előállítására szolgáló eljárás képezi.

Az eddig ismert antibiotikumokra rezisztens baktérium törzsek és vírusos megbetegedések egyre növekvő száma teszi szükségessé azt, hogy új gyógyszereket próbáljunk ki emberek és állatok kezelésében. A jelenleg alkalmazott számos kezelési mód és gyógyszer között ismertek olyanok, amelyben enzimek monomer formáját juttatják be különböző betegségekben szenvedő betegek kezelésére során. Néhány esetben erre azért van szükség, mert bizonyos betegségek során bizonyos enzimek aktivitásában (működőképességében) csökkenés tapasztalható. Az enzimek katalitikusan aktív fehérjék, amelyek az élő szervezetekben szinte az összes fő életfolyamatban részt vesznek. Így számos enzimet akár egyedileg, akár bizonyos kombinációkban különböztetnek meg fizikokémiai, fiziológiai vagy biológiai hatásai által.

A ribonukleázok az egyik olyan enzimes család a különböző enzimek közül, amelyekről ismert, hogy terápiás hatással bírnak illetve különböző betegségek során aktivitásuk csökken. A ribonukleázok a nukleáris (sejtmagban található) enzimek egyik csoportja, amelyek számos állatban és növényi organizmusban általánosan megtalálhatók. A ribonukleázok izolálására szolgáló eljárások vizsgálatát Schmidt és McDonalds indította el az 1950-es évek közepén. Ezzel az enzimmel kapcsolatos számos felfedezés közül az egyik megállapítás az volt, hogy rákos szövetekben nagymértékben csökkent ezen ribonukleázok aktivitása. Egy esetben kimutatták, hogy leukémiás egerekben a savas ribonukleáz aktivitás jelentős csökkenést mutat, mely különösen ezen állatok lépszöveiteiből nyert mitokondrium és mikroszóma frakciókban volt megfigyelhető. Ehhez hasonló tanulmányok azt jelezték, hogy ribonukleáz adagolással lehetséges a vírusos leukémiával együtt járó tünetek megelőzése vagy kezelése.

Sajnos a ribonukleáz alkalmazásával elérhető lehetséges előnyös hatásai nem valósíthatók meg elsősorban ezen enzim monomer formájának erősen toxikus tulajdonságának köszönhetően. Például tenyésztett fibroblasztokkal végzett vizsgálatokban citotoxikus hatás figyelhető meg monomer formában lévő ribonukleáz esetén még akkor is, ha igen alacsony dózisokat alkalmazunk. Nyilvánvaló, hogy olyan eljárás kifejlesztése szükséges, mely a ribonukleázzal elérhető lehetséges előnyös hatásokat maximalizálja, míg az enzim monomer formájával együttjáráó káros citotoxikus hatásokat minimalizálja.

Újabban felfedezték, hogy ribonukleázból olyan antivirális és antibakteriális készítményeket lehet alkotni, melyek nem fejtenek ki citotoxikus hatásokat, ha az enzim dimer formáin alapuló készítményt állítunk elő. Dimer formában lévő ribonukleáz készítmények alkalmazása hatásosnak bizonyult számos fertőző betegség kezelésében, és ugyanakkor nem okoz a monomer formával általánosan együttjáráó erősen citotoxikus hatásokat. Ribonukleáz dimerek különböző terápiás kezeléseknél történő alkalmazását ismertetik a WO 89/11 294 számon közrebocsátott nemzetközi (PCT) bejelentésben.

A ribonukleáz dimerek előállítására több eljárás is ismert, melyeket az alábbiakban ismertetünk röviden.

Wang és társai [Biochemistry 15 (3), 660–665. oldalak, (1976)] a dimerek előállítása során többféle pH-értéken dolgoztak, optimális intervallumnak a 7,5–8,0 pH-tartományt jelölték meg, és a maximális kitermelést 20% körül jelezték. A dimerizációs reakciót ammónium-acetát adagolásával állították le, azonban az el nem reagált ammónium-acetát a kapcsolószerrel reagál, azt további felhasználásra alkalmatlanná téve. A terméket egy lépésben tisztították oszlopkromatográfián.

Hartman és társai [Biochemistry 6, 2439–2448. oldalak, (1967)] 10,5-ös pH-értéken végezték a dimerizációt, kapcsolószerként dimetil-adipimátot alkalmazva.

Bartholeyns és társai a Wang-féle eljárás olyan változatát ismertették [Science 186, 444–445. oldalak, (1974)], melyben dimetil-parafaimidátot alkalmaznak kapcsolószerként. A dimerizáció előállítását és a tisztítást ugyanúgy hajtották végre, mint a Wang-féle módszernél.

A Koostra és társai által leírt módszer [Biochim. et Biophys. Acta 631 (3), 439–450 (1980)] lényeges elemeiben megegyezik a fent ismertetett Wang-féle módszerrel, és az apró változások nem hozhatók kapcsolatba a jelen találmány szerinti megoldással.

Bár a ribonukleáz dimerek monomer formájukból történő előállítására a fenti eljárások ismertek, változatlanul nagy fontossággal bír, hogy képesek legyünk a dimer forma nagy mennyiségének olcsó és hatékony úton való előállítására. Így nagyon kíváncsok egy olyan rendszer kidolgozása ribonukleáz dimerek előállítására, melynek segítségével szennyezőket – mint pl. monomereket, multimereteket és más szennyező anyagokat – minimális mennyiségben tartalmazó terméket lehet előállítani.

A jelen találmány tárgya a fentiekkel összhangban egy hatékony eljárás tisztított ribonukleáz dimer előállítására, melynek során

a) ribonukleáz oldatot állítunk elő úgy, hogy ribonukleáz monomereket adagolunk egy legalább 9-es pH-értékű puffer oldathoz,

b) egy parafaimidát kapcsolóreagenst adagolunk a ribonukleáz oldathoz, és a ribonukleáz monomereket dimerizáljuk, miközben a reakcióelegy pH-értékét nem engedjük 9 alá csökkenni,

c) a dimerizációs reakciót egy adott ponton leállítjuk,

d) a kapott dimerizált ribonukleázt folyadékkromatográfián tisztítjuk, oly módon, hogy a c) lépésben a dimerizációs reakciót úgy állítjuk le, hogy sav adagolásával az oldat pH-értékét $7 \pm 0,2$ -re csökkentjük, a kapott oldatot töményítjük, majd a d) tisztítási lépésben két folyadékkromatográfiás tisztítási lépést alkalmazunk, ahol az első tisztítási lépésben kapott, fő tömegében ribonukleáz dimert tartalmazó frakciót töményítés után vezetjük a második tisztítási lépésbe; és

kívánt esetben a kapott ribonukleáz dimert sómentesítjük a második kromatográfiás tisztítási lépés előtt vagy után, és

kívánt esetben a kapott ribonukleáz dimerből eltávolítjuk az endotoxinokat, és

kívánt esetben a tisztítás során kapott ribonukleáz monomereket tartalmazó frakciókat visszavezetjük a b) lépésbe.

A fenti eljárást alkalmazva nagy mennyiségű tisztított ribonukleáz dimer terméket állíthatunk elő, és e termék különösen alkalmas számos vírusos és bakteriális betegség kezelésében.

A jelen találmány tárgyát képező eljárás újdonsága és haladó jellege alapvetően azon a felismerésen alapszik, hogy a dimerizációs reakciót egyszerűen le lehet állítani a pH-érték 7-re történő csökkentésével, és így nincs szükség ammónium-acetáttal végzett lefojtásra, ezáltal lehetőség nyílik arra, hogy az el nem reagált monomereket tartalmazó oldatot visszavezessük egy újabb kapcsolási reakcióba, ami nyilvánvalóan jelentős megtakarítással jár, különös tekintettel az alkalmazott reagensek magas árára.

További előnye a találmány szerinti eljárásnak, hogy a két lépésben alkalmazott folyadékkromatográfiás tisztítás ipari méretű termelésre is kiválóan alkalmas.

Az 1. és 2. ábra a jelen találmánynak megfelelően végrehajtott ioncserélő kromatográfiával nyert elúciós kép grafikus megjelenítését mutatja.

A jelen találmány szerint ribonukleáz dimer formáinak előállításában bármely jelenleg hozzáférhető ribonukleáz monomert alkalmazhatunk kiindulási anyagként. Jelen találmányban olyan ribonukleáz monomereket alkalmazunk, amelyeket a Serva Feine BioChemica. GmbH. Heidelberg cégtől vásároltunk, katalógus szám: 28 260. Az alkalmazott monomerek tartalmazhatnak Ribonukleáz A-t vagy bármely más, a kereskedelemben hozzáférhető különböző ribonukleázt. A kapcsolási reakcióhoz a ribonukleáz monomereket úgy készítjük elő, hogy a ribonukleáz monomereket egy foszfát pufferben szobahőmérsékleten oldjuk fel egy ribonukleáz monomer oldat-készítése céljából. Az alkalmazott puffer előnyösen egy 0,1 mól/l dinátrium-hidrogén-foszfát dihidrát puffer, és a monomert az oldat legalább kb. 2 órán keresztül történő folyamatos keverésével oldjuk fel. Egy megfelelő puffer oldatot kb. 70 g dinátrium-hidrogén-foszfát dihidrát kb. 1000 ml vízben való oldásával készítünk. Bár az alkalmazott reagens és oldatok aktuális mennyisége a jelen találmányban változhat, a találmány szerinti dimerizációs reakciót kb. 40–60 g ribonukleáz monomernek egy kb. 5 liter dinátrium-hidrogén-foszfát dihidrát puffert tartalmazó főzőpohárban való feloldásával valósítjuk meg. Az is előnyös, hogy a monomer oldatot legalább 9 körüli, legelőnyösebben 10 körüli pH értékre állítsuk. A pH állítást 0,1 mól/l NaOH-dal végezhetjük.

A dimerizációs reakciót a ribonukleáz monomer oldathoz egy paraformidát kapcsoló reagens részletekben történő adagolásával engedjük végbemenni, mielőtt a pH-t legalább 9 körüli értékre vagy e fölött tartjuk, előnyösen 10 körüli értékre (10±0,2) tartjuk. A jelen találmányban előnyös egy dimetil-paraformidát kapcsoló reagens alkalmazása, de más ismert paraformidát kapcsoló reagens is használható. A fent ismerte-

tett módon készített monomer oldathoz előnyösen 4–6 g dimetil-paraformidát adunk, és a kapcsoló reagens kb. 1 percen belül oldódni fog. Mágneses keverőn vagy más eszközzel történő folyamatos keveréssel, a dimerizációs reakciót kb. 30–60 percig kb. 25 °C szobahőmérsékleten (25±5 °C) hagyjuk végbemenni. A reakciót pH 7 körüli (7±0,2) értékre való csökkentésével állítjuk le, és ez 1 mól/l HCl oldat adagolásával végezhető el. Ezen a ponton előnyös, ha a kapott keveréket bekoncentráljuk egy tangenciális áramlási rendszert alkalmazva, ahogy ezt alább részletesebben ismertetni fogjuk.

Hasznos, ha a kapcsolási reakció elindításától számított különböző időpontokban az oldatból vizsgálati mintákat veszünk és ezeket gélelektroforézis analízis alá vetjük. A gélelektroforézis vizsgálatok azt mutatják, hogy bár az enzim monomer formája szinte az összes vizsgált frakcióban tisztán látható, a ribonukleáz dimer formájának megfelelő csík világosan látható kb. 15 perc után, és ez a csík a reakció előrehaladásával egyre kifejezettebbé válik. Az enzim oligomer formái szintén megfigyelhetők a kapcsoló reagens hozzáadását követően kb. 30 perc múlva. A ribonukleáz monomer formájának relatív molekulatömege kb. 15 000, és a dimer formája kb. kétszer ekkora méretű.

Annak érdekében, hogy nagy mennyiségű terméket állítsunk elő, mely elsősorban tisztított ribonukleáz dimert tartalmaz, előnyös, hogy a dimerizált ribonukleáz oldatot legalább két szűrési lépésen vezessük keresztül azért, hogy izoláljuk a ribonukleáz dimert és eltávolítsuk a monomer vagy multimer formában lévő ribonukleázt. Az eltávolított nem dimerizálódott ribonukleáz monomereket ily módon összegyűjtjük és a jelen találmány szerint előnyösen visszavezetjük, ezzel tovább maximalizáljuk az enzim dimer formájának előállításának hatékonyságát.

A dimerizált ribonukleáz oldatból az oligomerek elválasztásának céljából előnyös, ha az oldatot egy folyadékkromatográfiás oszlopon szűrjük át. Az előnyös megvalósítás szerint a szűrést egy Sephadex gél-szűrő oszlop alkalmazásával végezzük. Egy 25 cm átmérőjű és kb. 120 cm hosszú Sephadex oszlopot készítünk, amit kb. 60 liter 50 mmól/l ammónium-hidrogén-karbonát, kb. 8,6 körüli pH-jú oldattal mosunk. Ezt a karbonát puffert kb. 4 g ammónium-hidrogén-karbonát 1000 ml vízben való oldásával készítjük. A fent kapott ribonukleáz oldat teljes mennyiségét az oszlopra viszszük és egy egyensúlyi pufferrel eluáljuk. Egy frakciószedő, mint pl. LKB 2211 Suprec, felhasználásával frakció oldatokat gyűjtünk, és az oldat áramlási sebessége durván 80 ml percenként. Az elúciós képet egy regisztráló berendezés, mint pl. LKB 2210, segítségével kirajzoltatjuk 0,5 mm/perc sebességet használva, és az adszorpciót 280 nm hullámhosszon egy LKB 2238 UNICOR SII fotométerrel mérjük.

Az így végzett szűrési lépéssel nyert elúciós kép általában három fehérjecsúcsot mutat: az első fehérjecsúcs a ribonukleáz multimereket jelzi, a második fehérjecsúcs a dimer formáknak felel meg, és az utolsó fehérjecsúcs az enzim monomer formában maradó

mennyiségének felel meg. Ezen a ponton tanácsos az egyedileg gyűjtött frakciók vizsgálatát elvégezni gélelektroforézis analízist alkalmazva. Ilyen vizsgálat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével végezhető amint ezt Thomas és munkatársai, PNAS 72,2626 (1975) cikkben közölték. Ezen elektroforetikus vizsgálat során mindegyik gyűjtött frakcióból előnyösen kb. 50 µl-t összekeverünk 50 µl fedő pufferrel és kb. 10 percig kb. 95 °C-on forraljuk. Ezt követően ebből a keverékből 25 µl-t töltünk be a gélzsebbe. Végül, az elektroforézist kb. 4 órán keresztül 20–35 mA áramerősséggel hajtjuk végre azért, hogy a ribonukleáz enzimek különböző formáit egymástól elválasszuk. A fehérjecsíkokat festékekkel, mint pl. Coomassie Blue R250 (Merck), történő festéssel tesszük láthatóvá.

A fenti SDS-PAGE elektroforézis rendszert alkalmazva a ribonukleáz monomer, dimer vagy oligomer formáit, vagy ezek keverékét tartalmazó frakciók azonosíthatók és egymástól elválaszthatók. A frakciók összetételének azonosítása után a főként dimer formát tartalmazó frakciókat izoláljuk és összegyűjtjük. Az összegyűjtött dimer frakciókat előnyösen 800 ml-re koncentrálnak be egy tangenciális áramlási rendszerben. A tangenciális áramlási rendszer membrán diafragmáját egy megfelelő oldattal újra mossuk úgy, hogy nagyobb mennyiségű dimert tartsunk vissza. Előnyösen ezt az oldatot liofilizáljuk és a további lépések elvégzéséig 4 °C-on tárolhatjuk. Ideális esetben a liofilizálást úgy végezzük, hogy az oldatot kb. 200 ml-es adagokra osztjuk szét 500 ml-es gömblombikba és folyékony nitrogén atmoszférában egy rotációs evaporátorba helyezzük. A gömblombikot tömítéssel szorosan lezárjuk és 30 percig –30 °C-on tartjuk, ezáltal az anyag liofilizálódik.

Mivel a kiindulási anyagok gyakran drágák lehetnek, különösen előnyös, ha az előző szűrési lépésben kiszűrt monomereket visszavezetjük a jelen találmány szerinti dimerizációs folyamatba. Ez úgy végezhető, hogy összegyűjtjük azokat a frakciókat, melyekben jelentős mennyiségű ribonukleáz monomereket azonosítottunk, ezeket egy tangenciális áramlási rendszert alkalmazva koncentrálnak, és a fenti kapcsoló reagenst adjuk hozzá. A kapcsolási reakció a fent ismertetett módon megy végbe, és előnyösen a fenti szűrési lépést is elvégezzük. A visszavezetett ribonukleáz liofilizálása után az újonnan kapott dimereket alaposan összekeverjük az első dimerizációs lépésben kapott dimerizált termékekkel. Ezzel a ciklizáló eljárással a dimer termék kitermelésének 30%-os növekedését érhetjük el.

A fent kapott elsődleges dimerizációs oldatot tovább tisztítjuk egy második szűrési lépést végezve abból a célból, hogy a dimereket még jobban elválasszuk a monomerektől és oligomerektől továbbá, hogy a végtermék tisztaságát tovább növeljük. Ebben az esetben előnyös, hogyha a fent kapott liofilizált enzimkeveréket egy géliszűrésre alkalmas anyagon, mint pl. Sephadex G 50 F oszlopon eluáljuk. Ebben a lépésben az is előnyös, ha az oszlopot 5 körüli pH értékre állítjuk, és

ezt egy 0,2 mól/l nátrium-acetát puffer alkalmazásával érhetjük el. A nátrium-acetát pH = 5 puffert kb. 27 g nátrium-acetát trihidrát 1000 ml vízben való oldásával készítjük.

A második fehérjecsúcsnak megfelelő összegyűjtött frakciókat, amint azt első szűrési lépésben végzett mérésekkel meghatároztunk, a Sephadex oszlopra viszzük. Előnyösen az első szűrési lépésben ismertetett körülményeket és anyagokat alkalmazhatjuk újra a frakciók második szűrési lépésénél is. Az elúciós képet ismét felvesszük és ezt használjuk a második szűrési lépést követően gyűjtött kívánt frakciók azonosításában és izolálásában. Ebben az esetben az elúciós kép egy nagymennyiségű dimert tartalmazó fő fehérjecsúcsot és csak két gyenge másodlagos fehérjecsúcsot mutat.

Újra előnyös, ha az összegyűjtött frakciókból elvégezzük a ribonukleáz enzimek SDS-PAGE analízisét, amint ezt fent jeleztük. E vizsgálatok szerint az elúciós kép fő fehérjecsúcsának megfelelő frakciók alaposan tisztított ribonukleáz dimer terméket tartalmaznak. Ezen a ponton a fő fehérjecsúcsának megfelelő frakciókat összegyűjtjük és előnyösen egy tangenciális áramlási rendszer segítségével koncentrálnak. Az is előnyös, ha ennél a pontnál egy sóalanítási lépést is végrehajtunk a frakciók Sephadex G25 oszlopon keresztül történő szűrésével. A sóalanítási lépést kivitelezhetjük egy 25 cm átmérőjű és 65 cm hosszú és 32 liter alapterfogatú oszlopon 15 liter/óra áramlási sebességgel működtetve. Továbbá, egy 50 mmól/l ammónium-hidrogén-karbonát puffert használunk.

Ennél a pontnál lévő termék alaposan tisztított ribonukleáz dimer terméket fog tartalmazni. Ahhoz azonban, hogy a liofilizált, ribonukleáz dimereket tartalmazó termékből egy gyógyászati alkalmas formát kapjunk, ajánlott, hogy a dimereket endotoxin eltávolítási folyamaton vezessük keresztül. Ezért előnyös, ha a fent kapott tisztított dimer terméket egy további kromatográfiás eljárásnak vetjük alá, mint pl. egy nagy endotoxin megkötő képességű Detoxigel oszlopon (Pierce Chemical Company, USA) keresztül eluáljuk. A detoxigel endotoxin megkötő képessége kb. 2 mg/ml. Mivel más komponensek, pl. fehérje dimerek, nonspecifikus kötődése is lehetséges, a dimerizált anyag maximális visszanyerése a pufferek fiziológiás pH tartományban való alkalmazásával érhető el. Egy maximális dimer kitermelés elérés érdekében 0,1–0,5 mól/l sóoldatot (pl. NaCl) adunk a szükséges pH tartományban. Általában 1500 endotoxin egység/ml (E. U./ml) endotoxin tartalmú oldatot detoxifikáló oszlopon való kromatográfiával 1,0 E. U./ml érték alá csökkenthető.

A ribonukleáz dimer oldat endotoxinoktól való megszabadítása után az oldatot összegyűjtjük, sterilre szűrjük, és liofilizáláshoz steril gömblombikokba osztjuk szét. A végtermék endotoxin tartalmát egy diagnosztizáló rendszer segítségével, mint pl. „Coatest (R)” (Kabi-Vitrum, München) határozhatjuk meg. Ez a vizsgálat a Limulus-AmoeboCytin-Lysat (LAL) endotoxinnal való aktiválásán alapszik. Az aktivált LAL p-nitroanalint, egy

sárga színű festéket hasít le a kromogén szubsztrátból (S-2423), melynek extinkcióját, mint az endotoxin tartalmat 405 nm-en spektrofotométeren mérjük. Ha az endotoxin tartalom 0,1 ng/mg alatti, a dimer oldatot gömbömbikokba rakjuk és liofilizáljuk.

A fenti folyamatot annyiszor ismételjük, ahányszor szükséges a kívánt mennyiségű ribonukleáz dimer végtermék eléréséhez. Az egyedi dimer termékeket tisztítás után sterilizálhatjuk vagy szükség szerint tovább liofilizáljuk, és homogén ribonukleáz dimert fogunk kapni, amely igen hatékony számos virális és bakteriális betegség kezelésében, mint azt a WO 89/11 294 számon közrebocsátott nemzetközi (PCT) szabadalmi bejelentésben ismertetik. Az anti-virális és anti-bakteriális hatás mellett a ribonukleáz dimerek más terápiás előnyökkel is bírnak, pl. gyulladásgátlóként és antihisztamin reagensként is ismertek az enzim monomer formájánál tapasztalt lehetséges citotoxikus hatás jelentkezése nélkül. A jelen eljárás különösen hasznos tisztított ribonukleáz dimer termékek nagy mennyiségben történő hatékony előállítására. A jelen találmány szerinti eljárását alkalmazva a kapott ribonukleáz dimer termékek enzimaktivitását ribonukleinsav oldatokon vizsgálhatjuk és a ribonukleáz dimer hozzáadása után egy spektrofotométeren követhetjük. Ezt az eljárást alkalmazva lehetőség nyílik alaposan tisztított dimer formában lévő enzim előállítására és az aktivitásának vizsgálatára is.

A következő példakkal a jelen találmány tárgyának bemutatását kívánjuk szolgálni anélkül, hogy bármely értelemben ezekre korlátozódnánk.

1. példa

Ribonukleáz dimerek előállítása

50 g ribonukleáz monomert egy 5 liter 0,1 mól/l dinátrium-hidrogén-foszfát dihidrát oldatot tartalmazó edényben oldunk fel, és a pH-t 0,1 mól/l NaOH oldattal 10-re állítjuk. A dinátrium-hidrogén-foszfát dihidrát puffert 70,98 g dinátrium-hidrogén-foszfát dihidrát 1000 ml vízben való oldásával készítjük. Ezután 5 g dimetil-parafaimidát (Sigma, No. 29F3687) kapcsoló reagenst adunk 25 °C-on (szobahőmérséklet), és a dimetil-parafaimidát 1 perc alatt feloldódik. Az oldat pH-ját folyamatosan ellenőrizzük és 10-re állítjuk 0,1 mól/l NaOH-dal. Mágneses keverővel az oldatot folyamatosan keverjük és a reakciót 45 percig végezzük kb. 25 °C-on. A reakciót a pH 7 körüli értékre való csökkentésével állítjuk le 1 mól/l HCl hozzáadásával.

A kapcsolási reakció elindítását követően különböző időpontokban vizsgálati mintákat veszünk, melyeket gélelektroforézissel analizálunk. A ribonukleáz monomereket, dimereket és multimereket SDS gélen választjuk el. Az alkalmazott ribonukleáz monomer relatív molekulatömege 15 000, a dimer formáé ennek kb. kétszerese. Az elektroforézissel végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a dimereknek megfelelő fehérjecsík tisztán látható 15 perccel a kapcsoló reagens hozzáadása után, és ez a fehérjecsík egyre kifejezettebbé válik a reakció előrehaladtával. Továbbá, a ribonukleáz oligomer formái 30 perc elteltével képződnek.

A dimerizált ribonukleáz oldatot 800 ml-re koncentrálnak be egy tangenciális áramlási rendszerben (Millipore). A Millipore rendszer egy Filtron Ausschuss 10 000 d szűrőt, egy 7 bar szakítószilárdságú olefin membránt és egy Verder 80W 20-30 # 60 079 típusú pumpát tartalmaz. A bemeneti nyomás 2 bar, a kimeneti nyomás minimálisan kisebb, mint 0,2 bar. A munkakapacitás kb. 1 liter óránként. A berendezés holttere kb. 400 ml, ezért a koncentrálnálási folyamat befejezésekor a berendezést 400 ml-re átöblítjük. Így a végtérfogat 1200 ml lesz.

A koncentrálnálási folyamatot ezután Sephadex G 50 F (Pharmacia) oszlopon való szűrési folyamatnak vetjük alá a dimerizációs folyamat alatt képződött különböző oligomer formák elválasztása érdekében. E szűréshez egy 25,2 cm átmérőjű és 120 cm hosszú oszlopot 60 liter 50 mmól/l ammónium-hidrogén-karbonát pufferral pH = 8,6 mossuk. Az 50 mmól/l ammónium-hidrogén-karbonát puffert 3,95 g ammónium-hidrogén-karbonát 1000 ml vízben való oldásával készítjük. Ezt követően az 1200 ml térfogatú fehérjeoldat teljes mennyiségét a gélágyra visszük és egyensúlyi pufferral eluáljuk. Kb. 1000 ml-es frakciókat gyűjtjük egy frakciószedő segítségével (LKB 2211) 15 percig, amely 80 ml/perc áramlási sebességgel felel meg. Az elúciós képet egy LKB 2210 regisztráló berendezéssel vesszük fel 0,5 mm/perc sebességet használva, és az abszorpciót 280 nm-en egy LKB 2238 UNICOR SII fotométeren mérjük. Az 2. ábrán látható elúciós kép három fehérjecsúcsot mutat, az első fehérjecsúcs a ribonukleáz multimereket jelzi, a második fehérjecsúcs a dimer formáknak, és az utolsó fehérjecsúcs az enzim monomer formáinak felel meg. Az 1. ábrán a vastag vonal a ribonukleáz oldat adszorpciós profilját jelzi nagyobb érzékenységgel mérve, míg az alacsonyabban futó vékony vonal egy kisebb érzékenységgel való mérést jelenti.

Ezután a ribonukleáz keveréket az egyedileg gyűjtött frakciókban SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) analizáljuk Thomas és munkatársai, PNAS, 72,2626 (1975) cikkében közölt eljárásnak megfelelően. Ebben az eljárásban mindegyik frakcióból 50 µl-t 50 µl fedő pufferral keverünk össze, és a keveréket 10 percig 95 °C-on forraljuk. Ezt követően a keverékből 25 µl-t a gélzsebekbe juttatunk. A vizsgálat során a standard IV (Merck) fehérjekomplexet alkalmazunk referenciaként, mely 12, 300, 30 000, 45 000, 66 200 és 76 000 molekulatömegű tartományt fed. Az alkalmazott fedő puffert az alábbi összetevőkből áll:

- 0,72 g Tris HCl (0,06 mól/l),
- 0,136 g EDTA (III) (5 mmól/l),
- 0,18 g glicerint (10%),
- 5 g SDS, a pH-t 7,2-re állítjuk (90 ml vizet adunk),
- 10 ml beta-merkaptotanol (10%).

A gélelektroforézishez 18%-os elválasztógélt készítünk, amelyre egy 3,9%-os gyűjtőgélt fektetünk. A 18% akrilamid tartalmú elválasztógél oldat az alábbi összetevőkből áll:

- 9 g akrilamid,
- 0,045 g bisz-akrilamid,

- 0,136 g Tris HCl pH = 8,8,
- 10 mg SDS,
- 100 µl 10%-os ammónium-persulfát oldat, és
- 10 µl TEMED.

Az SDS-poliakrilamid gélt úgy készítjük, hogy két 20 cm×20 cm nagyságú üveglemezt alaposan megtisztítunk és etanollal leöblítünk, majd ezeket egymásra helyezzük. A két lemez közötti rést, ahová a gélt fogjuk önteni, két, 1 mm vastagságú (20 cm hosszú, 1 cm széles) távtartó csík biztosítja. A távtartó csíkokat az üveglemezek bal és jobb szélére helyezzük. Az alsó szél egy textil tapadócsíkkal zárjuk le, és mind a három szél csipeszekkel erősítjük meg. A széleket ezenkívül még 1%-os agaróz oldattal is lezárjuk. Az agaróz megszilárdulása után a fenti elválasztógél oldatot függőleges helyzetben a hézagba töltjük az üveglemez tetejétől kb. 3 cm-rel lejjebb, és egy Pasteur-pipetta segítségével vizet rétegzünk a tetejére. A gél kb. 30 perc után polimerizálódik. A fedő vízréteget leöntjük, és a gél szélét egyszer fentebb ismertetett gyűjtőgél oldattal öblítjük.

Ezután a gyűjtőgél oldatot a felső szél tetejéig töltjük, és egy Teflon mintagyűjtő fésűt helyezünk be úgy, hogy a minta zsebek alja kb. 1 cm-rel magasabban legyenek az elválasztógél tetejétől. Kb. 15 perc múlva a gyűjtőgél polimerizálódik, és a fésű eltávolítható. Ezután a textil tapadócsíkot távolítjuk el és a gélt függőleges helyzetben az elektroforézis készülékbe helyezzük. A puffer tartályokat elektroforézis pufferrel töltjük fel [6 g Tris bázis, (0,05 mól/l); 28,5 g glicin (0,38 mól/l); 1 g SDS (0,1%); és 1000 ml H₂O] és a gél zsebeket egyszer a pufferrel átmoszuk. A ribonukleáz dimer mintákat fedőpufferben 10 percig 95 °C-on forraljuk és gélzsebeknek megfelelő vizsgálati mintaszettek területébe töltjük.

Az elektroforézist kb. 40 mA-en kb. 4 órán át végezzük. Ha azonban egy éjszakán keresztül való futtatás kívánatos, az áramerősséget kb. 6–8 mA-re csökkentve végezzük. A fehérjefront mozgását láthatóvá tehetjük, ha a fedő pufferbe 0,02% brómfenol-kék festéket keverünk. Az elektroforézist akkor fejezzük be, amikor a folyamat alatt mozgó fehérjefront a gél alját eléri. Az elválasztógélt levágjuk, kb. 30 percig egy fixáló oldatban festjük, majd 2 órán át egy 400 ml metanolt, 140 ml ecetsavat és 2000 ml vizet tartalmazó szintelenítő oldatban szintelenítjük. A fixáló oldatot 500 ml szintelenítő oldat és 12 ml festék oldat keverékéből állítjuk elő, mely festék oldatot 1 g Coomassie-kék (R250, Merck), 50 ml H₂O és 50 ml metanol keverékéből készítjük. A fehérjecsíkok láthatóvá tehetők a festék oldattal való festéssel, amint ezt fent jeleztük. Az SDS-PAGE technikát alkalmazva az eredmények azt jelzik, hogy a mintákban a ribonukleáz dimerek mennyisége fokozatosan növekszik, és végül multimerket tartalmazó frakciók is megjelennek.

Az összes olyan frakciót, melyek nagyrészt dimer formát tartalmaznak, összegyűjtjük és 800 ml-re koncentrálnak egy tangenciális áramlási rendszerben (Millipore). A membrán diafragmát újra 400 ml szűrlettel öblítjük, így a dimereket tartalmazó oldat teljes térfoga

1200 ml lesz. Ezután ezt az oldatot liofilizáljuk és a következő lépésig 4 °C-on tároljuk. A liofilizálást úgy végezzük, hogy az oldatot kb. 200 ml-es részletekben 500 ml-es gömblombikokba osztjuk. A gömblombikokat folyékony nitrogén atmoszférába helyezzük és egy rotációs evaporátorban (Heidolph VV60) megfagyasztjuk. A gömblombikokat tömítéssel szorosan lezárjuk és 30 percig -30 °C-on tartjuk. Végül ezt az anyagot a standard eljárással liofilizáljuk.

A folyamat további lépése előtt az első szűrési lépésben kiszűrt ribonukleáz monomereket összegyűjtjük és a dimerizációs folyamatba vezetjük vissza. Ez esetben az első szűrési lépés azon frakcióit, melyek főleg ribonukleáz monomereket tartalmaznak, összegyűjtjük és 4 literre konvertáljuk be a fentiekben ismertetett tangenciális áramlási rendszert alkalmazva. Ezután a monomer frakciókat dimerizáljuk a fenti kapcsoló reagenst használva. A reciklizált monomereket felhasználó kapcsoló lépést követően a fent jelzett szűrési lépést végezzük el, és ezzel a reciklizált monomereket most dimer formában kapjuk meg. Az első dimerizációs eljárásból kapott liofilizátumokat a reciklizált monomerekből nyert dimer liofilizátummal összekeverjük.

A fenti lépésekből nyert liofilizátum keveréket újra Sephadex G50F oszlopon keresztül kromatografáljuk azért, hogy a dimerek a monomerektől és oligomerektől történő jobb elválasztását érjük el. A kromatográfiás eljárást egy Sephadex G50F (Pharmacia) oszlopon 0,2 mól/l nátrium-acetát pH = 5 pufferben hajtjuk végre. A 0,2 mól/l nátrium-acetát puffert 27,22 g nátrium-acetát trihidrát 1000 ml vízben való oldásával készítjük. A kromatográfiás eljárást az első szűrési lépésben ismertetett körülmények között és berendezésben végezzük.

Ez esetben újra egy elúciós képet kapunk, mely a 2. ábrán látható. Ezen az ábrán a vastag vonal a ribonukleáz oldatok abszorpciós profilját jelenti nagyobb érzékenységen detektálva, mint a vékony vonallal jelzett profil. A nagyobb érzékenységgel felvett elúciós profil közepén egy nagy dimertartalmú fő fehérjecsúcsot, és csak két gyenge másodlagos fehérjecsúcsot láthatunk. A fehérjecsúcsokból vett enzimminták SDS-PAGE analízise a dimerek nagyobb felhalmozódását mutatja a fő fehérjecsúcsban az első szűrési lépésből származó elúciós profilhoz képest.

A fő fehérjecsúcs frakciót összegyűjtjük és a fenti tangenciális áramlási rendszerrel bekoncentráljuk. A sótalanításhoz ezen összegyűjtött frakciókat egy Sephadex G25 oszlopon engedjük keresztül. Az oszlop 25,2 cm átmérőjű és 65 cm hosszú, az alaptérfogata 32 liter, és 15 liter/óra áramlási sebességgel működtetjük. A második elúciós profil fő fehérjecsúcsából származó összesen maximálisan 5 liter ribonukleáz oldatot a Sephadex oszlopra visszük. A sótalanítást 50 mmól/l ammónium-hidrogén-karbonát pufferben végezzük. A sótalanítási lépés 90 percig tart, ami alatt 5 liter szűrletet gyűjtünk. A fennmaradó részt elöntjük. Felrajzoljuk az elúciós profilt és a kapott egyetlen fehérjecsúcsot egy 5 literes Schott-flaskába gyűjtjük. A tisztított vég-

termékből vett mintákat beta-merkaptotetanollal redukálva és nem redukált körülmények között vizsgáljuk. A tisztított végtermék SDS-PAGE analízise azt mutatja, hogy csak ribonukleáz dimerek vannak jelen.

Annak érdekében, hogy a liofilizált fehérjét gyógyászatilag hatékony formává alakítsuk, a ribonukleáz dimereket meg kell szabadítani az endotoxinoktól. E célból a tisztított dimereket egy Detoxigel oszlopon kromatografáljuk. A kívánt ribonukleáz dimer termék maximális visszanyerése szempontjából szükséges, hogy az alkalmazott pufferek fiziológiai pH tartományban legyenek. Ez sóoldat hozzáadásával valósítható meg. Az enzim oldatot a Detoxigel oszlopra visszük fel, és az endotoxinok kb. 1500 E. U./ml mennyiségben távolítjuk el. E lépés előtt a Detoxigel oszlopot 1% dezoxikoláttal regeneráljuk, ezt követően vízzel alaposan addig mossuk, míg az elfolyóban endotoxint tudunk kimutatni. Az oszlop térfogata 750 ml (9,5 cm átmérőjű és 14 cm hosszú), az oszlopot 0,1 mól/l ammónium-bikarbonáttal hozzuk egyensúlyba. Az endotoxin-mentes puffert steril vízzel keverjük. A ribonukleáz oldatot 2 liter térfogatban a gélagyra helyezük és hagyjuk, hogy beszívódjon a gélbe. A fehérjét ezután az egyensúlyi pufferrel eluáljuk és egy steril főzőpohárba gyűjtjük. Az oldatot egy steril gömblombikba visszük át liofilizálás céljából.

A készítmény endotoxin tartalmát egy „Coatest (R)” (Kabi-Vitrum, München) diagnosztikai rendszer segítségével határozzuk meg. Ez a vizsgálat a Limulus-Amoebocytin-Lysate (LAL) endotoxinnal való aktiválásán alapszik. Az aktivált LAL p-nitroanalint, egy sárga színű festéket hasít le a kromogén szubsztrátból (S-2423), és a színintenzitás csökkenését, mint az endotoxin tartalmat 405 nm-en spektrofotométeren mérjük. A 0,1 ng/mg alatti endotoxin tartalmú tisztított ribonukleáz dimer terméket gömblombikokba rakjuk és liofilizáljuk. A kapott termék (15 g, 30%-os kitermelés) egy liofilizált, alaposan tisztított ribonukleáz dimer oldat, mely további felhasználásig tárolható.

2. példa

Enzimaktivitás vizsgálata

A jelen találmány szerint előállított dimer ribonukleáz enzimaktivitását a Kunitz, J. Gen. Physiol., 24, 15 (1940) cikkben közölt aktivitás vizsgálattal lehet mérni. Ez a vizsgálat azon alapszik, hogy a ribonukleáz ribonukleinsavra való hatása következtében ennek abszorpciós spektruma az UV sávban a rövidebb hullámhosszúságú tartomány felé mozdul el. A 290–305 nm tartományban a nukleinsav koncentráció csökken a ribonukleázzal való emésztés eredményeképpen. A reakció kezdeti szakaszában a csökkenés lineáris és ez felhasználható az enzimaktivitás mérésére. Ebben a vizsgálatban a nukleinsav mennyiségének csökkenését 300 nm-en mérjük.

A vizsgálatot 25 °C-os állandó hőmérsékleten végezzük, és egy termosztálható küvetát használunk, így az összes oldat használat előtt 25 °C-on 5 percig kezelhető. A méréseket 300 nm-en egy spektrofotométerben végezzük. A reakcióelegy térfogata 3 ml, a reakciót 3 ml-es küvetában végezzük, mely 1 cm vastagságú.

A reakciókeveréket 1,5 ml ribonukleinsav oldatból és 0,05–0,5 ml ribonukleáz frakciókat magukba foglaló vizsgálandó mintából készítjük, és vízzel 10 ml-re egészítjük ki. A ribonukleinsav oldatot 80 mg ribonukleinsav és nátrium-só (Boehringer) 50 ml acetát pufferben való oldásával készítjük. Az acetát puffer 0,1 mól/l acetát puffer pH = 5, amit 0,57 ml ecetsav és kb. 80 ml desztillált víz keverésével készítünk, a pH-t 1 mól/l NaOH-dal 5-re állítjuk, desztillált vízzel 100 ml-re egészítjük ki és sterilre szűrjük. A ribonukleáz dimer frakciókat is magukba foglaló vizsgálandó mintákat 5 mg ribonukleáz dimer 5 ml vízben való oldásával készítjük és úgy hígítjuk, hogy a mért érték a megfelelő tartományon belül legyen.

A ribonukleinsav és a vizsgálandó minta oldatokat egy küvetában összekeverjük és a ribonukleinsav csökkenést kb. 20 percig Spectronic 1001 (Bausch & Lomb) spektrofotométeren mérjük. Az abszorpciós profilt kirajzoljuk és a lineáris tartományt kb. 8 percig észleljük. A reakciót 25 °C-on addig folytatjuk, míg teljesen végbe nem megy, ami kb. 3 óra múlva következik be. Az oldatokat újra mérjük a végső érték megállapítása miatt, és a méréseket kétszer ismétljük átlagérték meghatározásához.

Az enzimaktivitás számításához a nukleinsav extinkcióját meg kell határozni a reakció elején (E₀) és a ΔE/perc kezdeti lineáris szakaszon a reakció végén (E_e). A ribonukleáz dimer vizsgálandó minták hígítását úgy kell választani, hogy a ΔE/perc 0,007-nél ne legyen nagyobb. A reakcióhoz használt vak értékét, amelyet ribonukleázból és vízből készítünk, a mért értékekből ki kell vonni. Az enzim egységeként azt az enzim mennyiséget tekintjük, amely a vizsgálati körülmények között a szubsztrát E–E_e értékének percenként 100% csökkenését okozza 25 °C-on. A 300 nm-en megfigyelhető extinkció legnagyobb lehetséges értéke E₀–E_e. Az enzim specifikus aktivitását a következő összefüggésből számítjuk:

$(3 \times \Delta E / \text{perc})$ hígítási faktor

$(E_0 - E_e) \times \text{minta oldat térfogata (ml)}$

A jelen találmány szerint dimer ribonukleáz enzimek a szakirodalomban ismertett [lásd pl. Sorrentino és társai: Eur. J. Biochem, 124, 183–189 (1982)] enzimaktivitást mutatják.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás ribonukleáz dimer előállítására, melynek során

a) ribonukleáz oldatot állítunk elő úgy, hogy ribonukleáz monomereket adagolunk egy legalább 9-es pH-értékű puffer oldathoz,

b) egy parafaimidát kapcsolóreagenst adagolunk a ribonukleáz oldathoz, és a ribonukleáz monomereket dimerizáljuk, miközben a reakcióelegy pH-értékét nem engedjük 9 alá csökkenni,

c) a dimerizációs reakciót egy adott ponton leállítjuk,

d) a kapott dimerizált ribonukleázt folyadékkroma-

tográfiasan tisztítjuk, *azzal jellemezve*, hogy a c) lépésben a dimerizációs reakciót úgy állítjuk le, hogy sav adagolásával az oldat pH-értékét $7\pm 0,2$ -re csökkentjük, a kapott oldatot töményítjük, majd a d) tisztítási lépésben két folyadékkromatográfiás tisztítási lépést alkalmazunk, ahol az első tisztítási lépésben kapott, fő tömegében ribonukleáz dimert tartalmazó frakciót töményítés után vezetjük a második tisztítási lépésbe; és

kívánt esetben a kapott ribonukleáz dimert sómentesítjük és második kromatográfiás tisztítási lépés előtt vagy után, és

kívánt esetben a kapott ribonukleáz dimerből eltávolítjuk az endotoxinokat, és

kívánt esetben a tisztítás során kapott ribonukleáz monomereket tartalmazó frakciókat visszavezetjük a b) lépésbe.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a monomer ribonukleáz oldat pH-értékét $10\pm 0,2$ értékre állítjuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az a) lépésben nátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát oldatot alkalmazunk puffer oldatként.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapcsoló reagensok a monomer ribonukleáz oldathoz való adagolása közben az oldat pH-ját $10\pm 0,2$ értéken tartjuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy parafaimidát kapcsoló reagensként dimetil-parafaimidátot alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a b) dimerizációs lépést szobahőmérsékleten hajtjuk végre, előnyösen az oldat keverése mellett.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a dimerizációs reakciót HCl adagolásával állítjuk le.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a ribonukleáz dimert tartalmazó oldatot tangencionális áramlási rendszerben töményítjük az első folyadékkromatográfiás lépés előtt és/vagy után.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy folyadékkromatográfiás lépést egy olyan keresztkötött dextrán mátrix alkalmazásával végzünk, melynek peptidekre és globuláris fehérjékre vonatkozó molekulatömeg-frakciótartománya 1500–30 000.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a ribonukleáz monomer oldat 10 tömegrész ribonukleáz monomert tartalmaz 1000 tömegrész puffer oldatra vonatkoztatva, amelyhez 1 tömegrész mennyiségben adagoljuk a kapcsolószert.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a folyadékkromatográfiás lépés után kapott frakciót liofilizáljuk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első szűrési lépés után kapott, fő tömegükben monomer ribonukleáz tartalmazó frakciókat visszavezetjük a b) dimerizációs lépésbe.

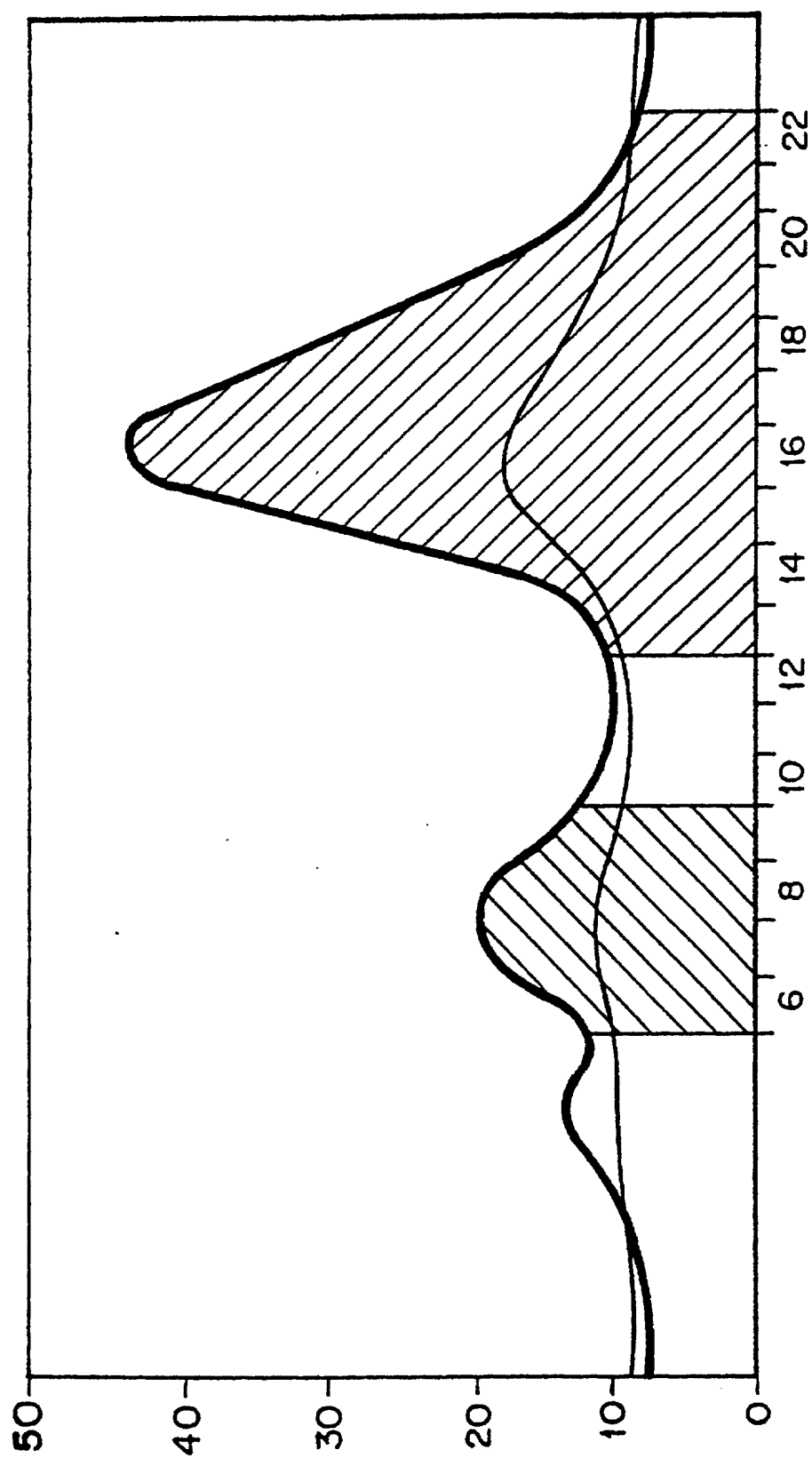
13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a legalább egy folyadékkromatográfiás lépést egy megfelelő ioncserélő gyanta alkalmazásával hajtjuk végre.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a második kromatográfiás lépést 5-ös pH-értéken hajtjuk végre, ahol a pH-értéket előnyösen nátrium-acetát pufferrel állítjuk be.

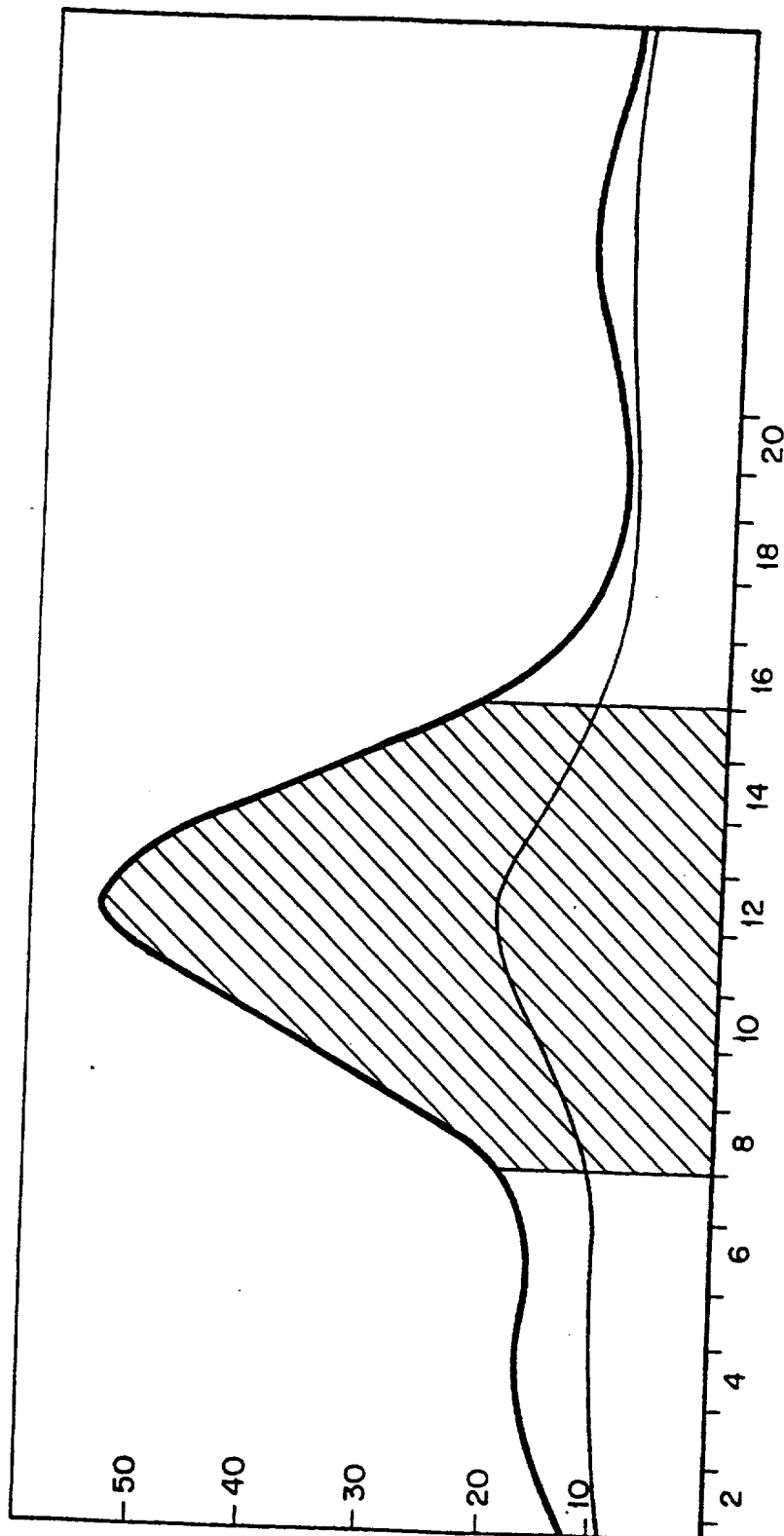
15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az első és/vagy második folyadékkromatográfiás lépések során összegyűjtött frakciókat gélelektroforézissel analizáljuk.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a második folyadékkromatográfiás lépést követően sómentesítési lépést hajtunk végre olyan keresztkötött dextrán mátrix alkalmazásával, melynek peptidekre és globuláris fehérjékre vonatkozó molekulatömeg-frakciótartománya 1500–30 000.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az endotoxinokat gélkromatográfiás módszerrel távolítjuk el endotoxint megkötő mátrixot alkalmazva.



1. ábra



2. ábra