



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 323217

(13) B1

(51) Int Cl.

*C07K 1/20 (2006.01)*

*C07K 1/14 (2006.01)*

*C07K 14/775 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19991208	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.09.08 PCT/SE97/01502
(22)	Inng.dag	1999.03.11	(85)	Videreføringsdag	1999.03.11
(24)	Løpedag	1997.09.08	(30)	Prioritet	1996.09.11, SE, 9603304 1996.09.26, US, 26739
(41)	Alm.tilgj	1999.05.11			
(45)	Meddelt	2007.01.29			
(73)	Innehaver	Pfizer Health AB, 11287 STOCKHOLM, SE			
(72)	Oppfinner	Hans Ageland, Bromma, SE Lena Nyström, Stockholm, SE Josefine Persson, Lund, SE Folke Tjerneld, Malmö, SE			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Fremgangsmåte for rensing av apolipoprotein A eller apolipoprotein E.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	Analsis, vol. 23, 1995, Menet et al. Chemical Abstracts, vol. 124, nr. 4, 22.01.1996, Robb et al. Chemical Abstracts, vol. 124, nr. 7, 12.02.1996, Berggren et al. WO 9012879 A2, WO 9300443 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for rensing av en hydrofob eller amfifil forbindelse, ved først å blande et utgangsmateriale inneholdende den hydrofobe eller amfifile forbindelse, med et første polymermateriale, vann og minst én av et andre polymermateriale og et overflateaktivt stoff, hvori det første polymermateriale og det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff ikke er blandbare i den resulterende primært vandige oppløsning. Fremgangsmåten omfatter videre opprettholdelse av den primært vandige oppløsning over en tidsperiode som er tilstrekkelig for i det vesentlige å separere de dannede faser, og så fjerning av fasen inneholdende hoveddelen av den hydrofobe eller amfifile forbindelse og det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff. Det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff separeres fra den hydrofobe eller amfifile forbindelse og resirkuleres deretter til det innledende blandingstrinn. Foreliggende oppfinnelse vedrører videre et preparat for anvendelse ved rensing av apolipoprotein A(ApoA) eller apolipoprotein E(ApoE), hvor preparatet omfatter et første polymermateriale og et overflateaktivt stoff, hvor polymermaterialet og det overflateaktive stoff ikke er blandbare i den primært vandige oppløsning erholdt etter blanding med vann. ApoA og ApoE fremstilt ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan anvendes til å fremstille et medikament for behandling av aterosklerose og kardiovaskulære sykdommer, sepsis eller perifer aterosklerose i tillegg til en fremgangsmåte for behandling av aterosklerose og kardiovaskulære sykdommer, sepsis eller perifer aterosklerose når det administreres i en terapeutisk effektiv mengde.

### Område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte for  
5 rensing av apolipoprotein A eller apolipoprotein E ved blanding  
av et utgangsmateriale inneholdende målforbindelsen, et første  
polymermateriale, vann og minst ett av et andre polymermateriale  
og et overflateaktivt stoff. Etter separering i to trinn utvinnes  
10 målforbindelsen mens det andre polymer- materiale og/eller det  
overflateaktive stoff resirkuleres til blandingstrinnet.  
Utgangsmaterialet er særlig en fermenteringsbuljong erholdt fra  
rekombinant produksjon ved hjelp av DNA-teknikker og  
målforbindelsen er apolipoprotein A eller apolipoprotein E,  
fremstilt ved hjelp av slike teknikker.

15

### Bakgrunn for oppfinnelsen

Vandige to-fasesystemer har omfattende anvendelse innen  
biokjemi og bioteknologi for rensing av biologiske materialer,  
slik som celler, proteiner, nukleinsyrer og steroider (se f.eks.  
20 P.-Å. Albertsson, Partition of cell particles and macromolecules,  
3. utg., Wiley, New York City, NY, USA (1986) og H. Walter et al,  
Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Academic Press,  
Orlando, FL, USA (1985). Systemene er egnet for biologiske  
materialer fordi hver fase inneholder fra ca. 70 til 90 vekt%  
25 vann, noe som i det vesentlige reduserer risikoen for  
denaturering av biomolekyler, slik som proteiner (H. Walter et  
al, Aqueous two-phase systems, Methods in Enzymology, vol. 228,  
Academic Press, San Diego, CA, USA (1994).

De vandige to-fasesystemer er omfattet av to polymer-  
30 materialer som ikke er blandbare, et polymermateriale i  
kombinasjon med en høy saltkonsentrasjon eller ett polymer-  
materiale i kombinasjon med et overflateaktivt stoff. Forhøyelse  
av konsentrasjonene over en viss kritisk verdi produserer to  
vandige faser som ikke er blandbare hvorved polymermaterialer,  
35 polymermateriale og salt eller polymer- materiale og  
overflateaktivt stoff er avdelt.

Avdelingen av proteiner i vandige to-fasesystemer er i  
det vesentlige avhengig av proteinhydrofobisitet, ladning og  
størrelse. Avdelingen kan influeres av forskjellige

polymermaterialer, molekylvekt til polymermaterialer, pH og tilsetning av salter til systemet (G. Johansson, Acta Chem. Scand., B 28 (1974), s. 873-882).

Vandige to-fasesystemer kan lett skaleres opp ettersom avdelingen av biologiske materialer, slik som proteiner, i det vesentlige er uavhengig av størrelsen til systemet. Tiden for fase-separering kan imidlertid forlenges i storskala-systemer, avhengig av f.eks. geometrien til separeringskaret.

I laboratorieskala anvendes vanligvis dekstran og polyetylenglykol (PEG) som de ikke blandbare polymermaterialer. Dekstran er imidlertid et relativt eksplosivt polymermateriale og for rensing i stor skala, f.eks. industriell skala ved ezymekstraksjon, er ulike kombinasjoner av PEG og salter mer sjeldent (K. Köhler et al, Methods in Enzymology, vol. 228, Academic Press, Orlando, FA, USA, (1994), s. 627-640).

US-A-4740304 til Perstorp AB omfatter preparater inneholdende hydroksyalkylstivelse for anvendelse i systemer med to eller flere faser for ekstraksjon, rensing, konsentrasjon og/eller separasjon av biologiske bestanddeler. I én foretrukken utførelsesform er hydroksyalkylstivelsen hydroksypropylstivelse (HPS). I en annen foretrukken utførelsesform er hydroksyalkylstivelsen kombinert med en annen polymer, f.eks. polyetylenglykol (PEG) eller polypropylenglykol. I eksemplene i US-A-4740304 er det anvendt ulike enzymer.

Anvendelsen av vandige to-fasesystemer for rensing av biomolekyler er imidlertid begrenset ettersom målproduktene forurenses med en fasesystempolymer, noe som således nødvendig-gjør ytterligere og kompliserte rensingstrinn. Hittil har målproduktene som skal renses vært avdelt til en saltoppløsning eller forblitt oppløst sammen med en fasesystempolymer. For å lindre dette problem har anvendelsen av termoseparerende polymermaterialer i vandige to-fasesystemer blitt introdusert. Dette gjør det mulig å utføre temperaturindusert fase-separering hvorved målbiomolekylet kan separeres fra polymermaterialet på en meget effektiv måte. Denne teknikk har vært anvendt i laboratorieskala for rensing av ulike enzymer. Således har temperaturindusert fase-separering vært anvendt for å rense 3-fosfoglyseratkinase og heksokinase fra bakegjærhomogenat (P.A. Harris et al, Bioseparation, vol. 2, (1991) s. 237-246). Videre

har temperaturindusert fase-separering vært anvendt for å rense to "ecdy"-steroider og glukose-6-fosfatdehydrogenase, henholdsvis (P.A. Alred et al, J. Chromatogr., vol. 628 (1993) s. 205-214 og P.A. Alred et al, Bioseparation, vol. 2 (1992), s. 363-373. P.A. Alred et al, J. Chromatogr. A, 659 (1994) s. 289-298 beskriver også temperaturindusert fase-separering for rensing av glukose-6-fosfatdehydrogenase, heksokinase og 3-fosfoglyseratkinase fra bakegjær.

EP-A-262651 til Union Carbide omfatter en fremgangsmåte for gjenvinning av enzymer fra vandige oppløsninger som inneholder minst ett polymermateriale som har anvendte oppløselighetskarakteristika. Fremgangsmåten omfatter forhøyning av temperaturen til oppløsningen over temperaturen for utfelling av polymermaterialet og separering av polymerpresipitatet fra den enzyminneholdende oppløsning. Polymermaterialet utvelges fortrinnsvis fra polyalkylenglykoler, slik som polyetylen- og polypropylenglykol, poly(oksyalkylen)polymerer eller kopolymerer, etoksylerede overflateaktive stoffer, silikonmodifiserte polyetere og polyvinylpyrrolidon. Temperaturen heves helst til en temperatur som er mindre enn ca. 90 °C, fortrinnsvis mellom ca. 50 °C og ca. 75 °C. I eksemplene i EP-A-262651 anvendes  $\lambda$ -amylase.

EP-A-0574050 til Gist-Brocades omfatter storskala-separering og rensing av hydrofobe fermenteringsprodukter. Fremgangsmåten omfatter tilsetning av det ønskede produkt og forurensende stoffer, et ikke-ionisk overflateaktivt stoff, et flokkulerende stoff, et ekstra overflateaktivt stoff og et salt til blandingen. Fermenteringsproduktet er helst et protein, og fortrinnsvis et enzym, som kan anvendes i detergentpreparater.

WO 96/23061 til Genencor International omfatter en overflateaktiv stoffbasert enzymekstraksjonsprosedyre hvori et hydrofilt fermenteringsprodukt, særlig et enzym av detergenttype, renses ved at en klar eller fullstendig fermenteringsbuljong inneholdende det ønskede produkt bringes i kontakt med ett eller flere salter og et egnet overflateaktivt stoff med en HBL-verdi på ca. 12. Fermenteringsbuljongen, saltet og det overflateaktive stoff separeres i to faser, én med mye overflateaktivt stoff og det ønskede produkt og den andre med mye salt(er).

Garg et al, Biotechnol. Appl. Biochem. 20 (1994) s. 199-215 omfatter anvendelse av temperaturindusert fasedannende

detergent (Triton X-114) som ligandbærer for affinitetsadskillelse i et vandig trefasesystem. Triton X-114 ble modifisert med Cibacron-blå for å gi et detergentfargekonjugat, som ble anvendt som en affinitetsligand for enzymlaktatdehydrogenase (LDH). Når et overskudd av detergent ble anvendt ble et trefasesystem med en detergentrik midtfase dannet.

Detergentfargekonjugater ble adskilt til denne detergentrike fase. Enzymet ble gjenvunnet ved å innhente den detergentrike konjugatinneholdende fase og utsette denne for temperaturindusert faseseparering.

Ut fra det ovennevnte er det tydelig at anvendelsen av tofase-separering primært er rettet mot rensing av hydrofile makromolekyler, særlig enzymer. Anvendelse av tofasesystemer for rensing av hydrofobe lipoproteiner er imidlertid kjent. Wiegel et al omfatter således avdeling av høydensitetslipoproteiner (HDL) i tofasesystemer (J. Chromatogr. B, 661 (1994) s. 159-164). Her anvendes dekstran og PEG for separering av HDL-partiklene. Den foretrukne anrikelse av HDL-partikler i den dekstranrike mer hydrofile bunnfase skyldes hydrogenbinding mellom dekstran og molekyllene som utgjør HDL-partiklene (apoproteinet til HDL).

Hovedfunksjonen til lipoproteiner i plasma er å transportere lipider, slik som kolesterol og triglyserider. Det er fire hovedklasser av lipoproteiner: chylomikroner (CM), lipoproteiner med meget lav densitet (VLDL), lipoproteiner med lav densitet (LDL) og lipoproteiner med høy densitet (HDL). Av disse er HDL direkte involvert i fjerningen av kolesterol fra perifere vev, frakte dette tilbake til enten leveren eller til andre lipoproteiner, ved hjelp av en mekanisme kjent som "revers kolesteroltransport" (RCT).

Den "beskyttende" rolle til HDL er bekreftet i flere studier. Senere studier rettet mot den/de beskyttende mekanisme(r) til HDL har fokusert på apolipoprotein A-I (Apo-A-I), hovedbestanddelen av HDL. Høye plasmanivåer av ApoA-I er forbundet med en redusert risiko for CHD og tilstedeværelse av koronarlesjoner.

Flere fremgangsmåter er foreslått for rensing av lipoproteiner, slik som ApoA og ApoE, enten fra plasma eller produsert ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker. Ved laboratorieskala anvendes vanligvis sentrifugering,

ionebyttekromatografi, affinitetskromatografi, isoelektrisk  
fokusering, gelfiltrering og høypresisjonsvæskekromatografi  
(HPLC) (se Methods in Enzymology, vol. 128, Academic Press, San  
Diego, CA, USA (1986). Det er imidlertid et behov for en  
5 ytterligere rask, sensitiv og pålitelig fremgangsmåte for  
fremstilling av ApoA og ApoE, særlig i en industriell eller  
forsøksanleggsskala.

Som tidligere slått fast har anvendelsen av  
tofaseseparering vært primært rettet mot rensing av hydrofile  
10 makromolekyler. Optimalisering av tofasesepareringsteknikken for  
rensing av apolipoprotein A eller apolipoprotein E vil øke  
antallet proséssteknikker tilgjengelige for rensing av  
lipoproteiner, slik som ApoA eller ApoE. Formålet med  
foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en slik teknikk.

15

#### Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte for  
rensing av apolipoprotein A eller apolipoprotein E,  
kjennetegnet ved at den omfatter

- 20 a) blanding, i tilfeldig rekkefølge, av et utgangsmateriale  
inneholdende apolipoprotein, et første polymermateriale som er  
hydrofilt, vann, et andre amfifilt polymert materiale og et  
overflateaktivt stoff, hvor det første polymermateriale og det  
andre polymermateriale ikke er blandbare i den resulterende  
25 primært vandige oppløsning, og;
- b) opprettholdelse av den primært vandige oppløsning over en  
tidsperiode som er tilstrekkelig for i det vesentlige å separere  
de dannede faser;
- c) fjerning av en fase inneholdende hoveddelen av  
30 apolipoproteinet og det andre polymermateriale og/eller det  
overflateaktive stoff;
- d) separering av apolipoproteinet fra det andre polymermateriale  
og det overflateaktive stoff ved en temperatur som induserer  
separering; og deretter
- 35 e) resirkulering av det separerte, andre polymermateriale og det  
overflateaktive stoff til det innledningsvise blandingstrinn (a).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

En målsetning med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en effektiv rensingsprosess for produksjon av apolipoprotein A eller E ved et lavt nok innhold av urenheter for å forebygge behovet for ytterligere rensingstrinn.

En videre målsetning med foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for å tilveiebringe et høyt utbytte av nevnte forbindelser, dvs. en fremgangsmåte med minimalt tap av produkt.

En annen målsetning med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en effektiv fremgangsmåte, hvor, når det gjelder biologiske entiteter, den biologiske aktivitet til apolipoprotein A eller E i det vesentlige er bevart.

En ytterligere målsetning med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en økonomisk lønnsom og miljøvennlig fremgangsmåte der en vesentlig mengde av forbindelsene resirkuleres for fornyet anvendelse.

De ovenfor angitte målsetninger er imøtegått ved foreliggende oppfinnelse, som omfatter en fremgangsmåte for rensing av apolipoprotein A eller E ved

- a) blanding i skjønsmessig rekkefølge, utgangsmaterialet inneholdende apolipoprotein, et første polymermateriale, vann og minst én av et annet polymermateriale og et overflateaktivt stoff, nevnte første polymermateriale og det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff ikke er blandbare i den resulterende primære vandige oppløsning, og;
- b) opprettholdelse av den primære vandige oppløsning for en tidsperiode som er tilstrekkelig for i det vesentlige å separere de dannede faser;
- c) fjerning av fasen inneholdende hoveddelen av apolipoproteinet og det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff;
- d) separering av apolipoprotein A eller apolipoprotein E fra det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff; og deretter
- e) resirkulering av det separerte andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff til det innledningsvise blandingstrinn (a).

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en økonomisk gunstig og miljøvennlig vandig tofasefremgangsmåte for rensing av apolipoprotein, ettersom det andre polymermateriale og/eller det

overflateaktive stoff kan resirkuleres flere ganger med kun små tap ved hver syklus, mens renheten og utbytte av apolipoprotein A eller apolipoprotein E fremstilt ifølge foreliggende fremgangsmåte i det vesentlige vil være uforandret. Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har særlig funnet at vandig tofase-separering i kombinasjon med temperaturindusert fase-separering og resirkulering av ett eller flere kjemikalier kan anvendes effektivt til å rense lipoproteiner, slik som ApoA og ApoE.

Med foreliggende oppfinnelse er det mulig å resirkulere minst ca. 60 % av den innledningsvise mengde av det andre polymermateriale og/eller overflateaktive stoff, helst minst 70 % og fortrinnsvis minst 80 % av den innledningsvise mengde av det andre polymermateriale og/eller overflateaktive stoff til det innledningsvise blandingstrinn.

I det primært vandige tofase-separeringstrinn kan ulike varierte kombinasjoner av komponenter anvendes, dvs. et første polymermateriale og et andre polymermateriale, et første polymermateriale og et overflateaktivt stoff, eller et første polymermateriale, et andre polymermateriale og et overflateaktivt stoff. Ved alle disse utførelsesformer må bestanddelene være ublandbare i den primære vandige oppløsning. I utførelse av oppfinnelsen bør derfor et polymert materiale være i det vesentlige hydrofilt og det andre være mer hydrofobt, men fortsatt vannoppløselig, dvs. amfifilt. Konsentrasjonene av det første og andre polymermateriale bør også være høy nok til å gjennomføre en fase-separering i minst to faser. Eksempler på hydrofile første polymermaterialer egnet for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse omfatter hydroksyalkylcellulose, hydroksyalkylstivelser, stivelse, dekstran, pullulan og derivater og blandinger derav. Pullulan er et mikrobielt polysakkarid tidligere anvendt for rensing av enzymer i vandige tofasesystemer (Nguyen et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 27 (1988) s. 341-346). Hydroksyalkylstivelsene er i det vesentlige utvalgt fra gruppen bestående av hydroksymetylstivelse, hydroksyetylstivelse, hydroksypropylstivelse og hydroksybutylstivelse og blandinger derav. Molekylvekten til det hydrofile, første polymermateriale kan være i området fra ca. 5000 til 5000000 Da, helst i området fra 40000 til 500000 Da og fortrinnsvis i området fra 100000 til

300000 Da. Spesifikke eksempler på hydroksyalkylstivelser egnet for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter Reppal PES 100 og Reppal PES 200, begge er hydroksypropylstivelser markedsført av Carbamyl AB i Kristianstad, Sverige. Den  
5 gjennomsnittlige molekylvekt til henholdsvis Reppal PES 100 og Reppal PES 200 er 100000 Da og 200000 Da.

Som angitt i forrige avsnitt skal det andre polymermateriale være amfifilt og vannoppløselig. Apolipoprotein A eller apolipoprotein E vil ekstraheres inn i den mer hydrofobe  
10 fase og ved dette separeres fra mer hydrofilt forurensende stoffer, slik som fyllproteiner, vanligvis til stede i plasma og urene eller delvis rensede oppløsninger/fermenteringsbuljonger fra rekombinante DNA-prosesser. Eksempler på slike forurensende stoffer er proteiner fra *E. coli*. I forsøkene beskrevet i  
15 eksemplene ifølge foreliggende oppfinnelse var den amfifile kopolymer og det overflateaktive stoff til stede hovedsakelig i toppfasen. I disse forsøk var derfor hoveddelen av ApoA eller ApoE fordelt til toppfasen som inneholdt mye kopolymer og overflateaktivt stoff.

20 Det andre polymer- materiale har fortrinnsvis invers oppløselighet. Med begrepet "invers oppløselighet" menes at oppløseligheten til polymermaterialet varierer, inverst med oppløsningstemperaturen. Dette betyr at oppløseligheten til polymermaterialet øker med økende oppløsningstemperatur. Invers  
25 oppløselighet er derfor direkte motsatt til temperatureffekten fremvist i de fleste oppløsninger.

Preparater inneholdende tre eller flere polymer- materialer er også beskrevet. Multi-fasesepareringer kan således  
30 erholdes ved utvelgelse av egnede kombinasjoner av tre eller flere polymermaterialer og tilstrekkelige høye konsentrasjoner derav i den primært vandige oppløsning.

I foreliggende oppfinnelse omfatter begrepet "primært vandige oppløsninger" det innledningsvise prepareringstrinn før separering til minst to faser, med mindre annet er angitt.  
35

Den primære oppløsning er vandig dvs. at hoveddelen av oppløsningsmidlet er vann. Vann kan tilsettes separat eller sammen med enhver av komponentene som er nødvendige for det primære separasjonstrinn. En eller flere vandige oppløsninger inneholdende apolipoprotein A eller apolipoprotein E, første

eller andre polymermateriale eller overflateaktive stoff kan således anvendes for å introdusere komponenten per se så vel som vannet krevet for å lage den primært vandige oppløsning.

Konsentrasjonen av målforbindelsen i den primært vandige oppløsning kan være i området fra ca. 0,1 g/l opp til ca. 50 g/l av den primært vandige oppløsning, helst innen området fra 0,5 til 20 g/l og fortrinnsvis innen området fra 1 til 10 g/l.

Konsentrasjonen av det hydrofile, første polymermateriale i den primært vandige oppløsning kan være i området fra ca. 1 til ca. 30 vekt% av den totale vekt til den primært vandige oppløsning, helst innen området fra 3 til 20 vekt% og fortrinnsvis innen området fra 5 til 15 vekt%.

I den primært vandige oppløsning kan konsentrasjonen av det amfifile, andre polymermateriale være i området fra ca. 0,5 til ca. 30 vekt% av den totale vekt til den vandige oppløsning, helst innen området fra 3 til 20 vekt% og fortrinnsvis innen området fra 5 til 15 vekt%.

I den primært vandige oppløsning kan forholdet mellom konsentrasjonen av målforbindelsen og det amfifile andre polymermateriale være i området fra ca. 3:1 til ca. 1:2500, med hensyn til vekt, helst innen området fra 2:3 til 1:400 beregnet på vekt og fortrinnsvis innen området fra 1:3 til 1:150 med hensyn til vekt.

I den primært vandige oppløsning kan forholdet mellom konsentrasjonen av det hydrofile, første polymermateriale og det amfifile, andre polymermateriale være i området fra ca. 20:1 til ca. 1:10 beregnet med hensyn til vekt, helst innen området fra 10:1 til 1:5 med hensyn til vekt, og fortrinnsvis innen området fra 5:1 til 1:2 med hensyn til vekt.

Etter blanding av den hydrofobe og hydrofile forbindelse, f.eks. ApoA eller ApoE, med det første polymermateriale og det andre polymermateriale og/eller overflateaktivt stoff opprettholdes den primært vandige oppløsning over en tidsperiode som er tilstrekkelig for i det vesentlige å separere minst to faser som er dannet. Denne tidsperiode kan være i området fra ca. 2 minutter til ca. 5 timer, helst i området fra 5 minutter til 2 timer og fortrinnsvis i området fra 10 minutter til 1 time. Tidsperioden krevet for faseseparering kan imidlertid reduseres ved anvendelse av f.eks. sentrifugeseparering,

sentrifugesentrifugering eller sentrifugedekantering, før den primært vandige oppløsning separeres til minst to faser. Dersom slike midler anvendes kan tidsperioden for separeringen til minst to faser være i området fra ca. 5 sekunder til ca. 60 minutter og  
5 helst i området fra 10 sekunder til 30 minutter.

Temperaturen til den primært vandige oppløsning er helst i området fra ca. 5 til 40 °C og fortrinnsvis i området fra 15 til 30 °C.

I en videre utførelsesform er en forbindelse inne-  
10 holdende to eller tre nitrogenatomer bundet til et karbonatom til stede i den primært vandige oppløsning. På denne måte kan en forbedret rensing og et høyere utbytte erholdes, ettersom målforbindelsen lettere avdeles til den mer hydrofobe fase. Egnede eksempler på slike nitrogeninnholdende forbindelser er  
15 urea, arginin, guaninhydroklorid, benzamidin og blandinger derav, fortrinnsvis urea. Dersom dette anvendes bør konsentrasjonen av forbindelsen inneholdende to eller tre nitrogenatomer bundet til et karbonatom være i området fra ca. 0,5 M til metning, helst i området fra 1 M til 8 M og fortrinnsvis i området fra 1,5 M til 6  
20 M.

I den primært vandige oppløsning kan forholdet mellom målforbindelse og den nitrogeninnholdende forbindelse være i området fra ca. 1:1 til ca. 1:5000 med hensyn til vekt, helst i området fra 1:4 til 1:700 med hensyn til vekt, og fortrinnsvis i  
25 området fra 1:6 til 1:250 med hensyn til vekt.

Avdeling av målforbindelsen til den mer hydrofobe fase kan forsterkes ved tilsetning av en forbindelse med en hydrofob virkning på den primært vandige oppløsning. Egnede forbindelser omfatter uorganiske salter inneholdende kationer, slik som  
30 rettkjedet eller forgrenet trimetylammonium, trietylammonium, tripropylammonium, tributylammonium, tetrametylammonium, tetraetylammonium, tetrapropylammonium og tetrabutylammonium og anioner, slik som fosfater, sulfat, nitrat, klorid og hydrogenkarbonat. Et spesifikt eksempel er trietylammoniumfosfat.

35 Avdelingen av molekyler mellom fasene i tofasesystemer er avhengig av avdelingskoeffisienten  $K$ . Den er definert som

$$K = C_T/C_B \quad (1)$$

hvor  $C_T$  = konsentrasjonen av toppfasen til molekylet av interesse

5  $C_B$  = konsentrasjonen i bunnfasen av molekylet av interesse

Ved mange anledninger er fordelingsgraden,  $G$ , anvendt ved avdelingsforsøk. Denne er definert som forholdet mellom den  
10 totale mengde av deltagende substans i hver fase:

$$G = K \times (V_T/V_B) \quad (2)$$

hvor

15  $V_T$  = volum i toppfasen

$V_B$  = volum i bunnfasen

Avdelingen av molekyler mellom fasene i tofasesystemer kan vises i fasediagrammer. Her kalles grenselinjen mellom én og  
20 to faser binodialkurven. Polymerkonsentrasjonen av de to faser i likevekt med hverandre er beskrevet ved hjelp av siktelinjer i fasediagrammet. Økning av polymerkonsentrasjonen, dvs. økning av siktelinjelengden, fører til mer ekstrem avdeling i tofasesystemer (G. Johansson, *Methods in Enzymology*, vol. 228  
25 (1994) s. 28-42). Det ligger innen kompetansen til fagfolk på området å utføre forsøk for å nå tilstander for egnet avdeling mellom de to faser.

To egnede kombinasjoner av et hydrofilt, første polymermateriale og et amfifilt, andre polymermateriale for  
30 anvendelse i foreliggende oppfinnelse er Reppal PES 200 i kombinasjon med UCON 50-HB-5100 og Reppal PES 200 i kombinasjon med EO<sub>30</sub>PO<sub>70</sub>. Fasediagrammer som viser avdelingen mellom de to faser i disse systemer er gitt i henholdsvis P.A. Alred et al, *Journal of Chromatography*, 659 (1994) s. 289-298, og R.F. Modlin et al, *Journal of Chromatography*, 668 (1994) s. 229-236.  
35

Tilstedeværelsen av et overflateaktivt stoff i den primært vandige oppløsning er ment for å øke avdelingen av apolipoprotein A eller apolipoprotein E til den mer hydrofobe fase. Av denne grunn er det overflateaktive stoff helst amfifilt,

dvs. en forbindelse inneholdende en hydrofil, vannoppløselig gruppe som peker mot det vandige miljø og en hydrofob vannoppløselig gruppe som peker mot apolipoprotein A eller apolipoprotein E. Den hydrofile gruppe har fortrinnsvis den

5 kjemiske struktur til det andre polymermateriale, ettersom dette letter delingen av både det andre polymermateriale og det overflateaktive stoff til toppfasen i det primært vandige system.

Amfifile overflateaktive stoffer er kjennetegnet ved den kritiske micellekonsentrasjon (CMC), som er minimums-

10 konsentrasjonen for det overflateaktive stoff til å danne fullstendige miceller. Amfifiler er videre kjennetegnet ved deres hydrofile-lipofile balanse (HLB). HLB-verdien er et kvantitativt mål for den generelle hydrofile egenskap til det overflateaktive stoff av betydning, hvori en høyere HLB-verdi menes en økt

15 hydrofil karakter til det overflateaktive stoff. I foreliggende oppfinnelse er HLB-verdien helst i området fra ca. 5 til ca. 80, fortrinnsvis i området fra 8 til 30 og foretrukket i området fra 10 til 20. HLB-verdier for mange overflateaktive stoffer kan finnes i McCutcheons, vol. 1, Emulsifiers and Detergents, Nord-

20 Amerika, utg., 1993.

I en særlig foretrukket utførelsesform er det anvendt et annet polymert materiale med invers oppløselighet. I dette tilfellet utføres temperaturindusert fase-separering etter det primært vandige tofasetrinn ved oppvarming av fasen inneholdende

25 hoveddelen av apolipoprotein A eller apolipoprotein E til en temperatur over tåkepunktet for det andre polymermateriale. Dette fenomen kan anvendes og det kan dras fordel av dette også med overflateaktive stoffer med invers oppløselighet. Ved utvelgelse av et egnet overflateaktivt stoff og egnede fremgangsmåte-

30 betingelser med hensyn til konsentrasjon av de ulike bestanddeler, pH, ionestyrke og temperatur er det således mulig å separere det overflateaktive stoff som har invers oppløselighet fra apolipoprotein A eller apolipoprotein E. I foreliggende oppfinnelse er det også ønskelig å anvende en kombinasjon av et

35 annet polymermateriale med invers oppløselighet og et overflateaktivt stoff med invers oppløselighet der tåkepunktet kan være likt eller forskjellig for de to stoffer.

Informasjon omfattende de andre polymermaterialer med invers oppløselighet er generelt like anvendbar på overflateaktive stoffer med invers oppløselighet.

Eksempler på overflateaktive stoffer som med fordel kan anvendes i den primært vandige oppløsning, omfatter ikke-ioniske, anioniske og kationiske overflateaktive stoffer. Det er egnet å anvende et amfifilt overflateaktivt stoff som kan gi invers oppløselighet og fortrinnsvis et ikke-ionisk overflateaktivt stoff. Ikke-ioniske overflateaktive stoffer egnet for anvendelse i foreliggende oppfinnelse omfatter alkyletoksylater, polyoksyetylen-sorbitanfettsyreestere, blokkopolymerer, polyoksyetylenalkylestere, polyglykoletere og alkylglykosider. Foretrukket er overflateaktive stoffer inneholdende polyetylenglykolhale som ligner den kjemiske struktur til de foretrukne andre polymermaterialer, f.eks. UCON 50-HB-5100 og Breox PAG50A 1000. Eksempler på alkyletoksylater er polyoksyetylenoktylfenyletere, f.eks. "Triton X-100" og "Triton X-114", begge solgt av Union Carbide i USA, "Triton X-100" og "Triton X-114" har et hydrofob oktylfenylhode og en hydrofil polyoksyetylenhale med et blakningspunkt på hhv. 22 °C og 65 °C. blakningspunktet til analoger kan økes ved å øke lengden til den hydrofile rest, mens blakningspunktet kan reduseres ved å øke lengden på den hydrofobe rest. "Triton X-100" er videre kjenne- tegnet ved en HLB-verdi på 30,5. Eksempler på polyoksyetylen-sorbitanfettsyreestere er poly-etylen-(20)-sorbitanmonolaurat, f.eks. "Tween 80" og polyoksyetylen-(20)-sorbitanmonooleat, f.eks. "Tween 20", begge solgt av ICI i Storbritannia. Eksempler på blokkopolymerene er kombinasjoner av polypropylenglykol og polyetylenglykol, f.eks. "Pluronic" solgt av BASF i Tyskland. Egnede eksempler på polyoksyetylenalkylestere er  $C_{12}E_5$ ,  $C_{12}E_8$  og Brij. Et egnet eksempel på en polyglykoleter er Tergitol.

Anioniske overflateaktive stoffer egnet for anvendelse omfatter ulike gallesyrer og -estere og salter derav, slik som salter av deoksykolinsyre og kolinsyre. Spesifikke eksempler omfatter natriumdeoksykholat og natriumkholat. Andre egnede anionoverflateaktive stoffer omfatter salter av alkylsulfonsyre og alkylsvovelsyre. For eksempel natriumdodecylsulfat (SDS).

Kationiske overflateaktive stoffer som er egnet for anvendelse, omfatter salter av alkyltrimetylammonium, f.eks. CTAB

og CTAC, salter av cetylpyridinium og salter av dimetyloktadecylammonium.

De overflateaktive stoffer anvendt kan modifiseres for å forbedre deres egenskaper i de vandige tofasesystemer. For eksempel ved introduksjon av farge, slik som Cibacron-blått. Av økonomiske og enkelhetsgrunner er det imidlertid foretrukket å anvende overflateaktive stoffer som umodifiserte.

Konsentrasjonen av det overflateaktive stoff i den primært vandige oppløsning kan være i området fra ca. 0,1 til ca. 30 % (vekt/vekt), fortrinnsvis i området fra 0,25 til 20 % (vekt/vekt) og helst i området fra 0,5 til 10 % (vekt/vekt).

Det er foretrukket at konsentrasjonen av det overflateaktive stoff i den primært vandige oppløsning er lik eller høyere enn CMC. CMC er primært avhengig av det overflateaktive stoff per se, komponentene i oppløsningen og deres konsentrasjon, temperatur og pH. CMC til polyoksyetylsorbitorbitanfettsyreestere (polysorbater) er spesifikt angitt i en artikkel til Wan et al, J. Pharm. Sci., vol. 63, nr. 1 (1974) s. 136-137.

Etter den primære tofaseseparering fjernes den vandige fase inneholdende hoveddelen av apolipoprotein A eller apolipoprotein E og det andre polymermateriale og/eller det overflateaktive stoff. Apolipoprotein A eller apolipoprotein E separeres deretter fra det andre polymermateriale og/eller overflateaktive stoff, f.eks. ved kromatografi, slik som affinitets- eller ionebyttekromatografi eller ved løsningsmiddelekstraksjon. Det er også mulig å anvende enda et annet tofasesystem inneholdende et tredje polymert materiale eller et salt, helst et uorganisk salt, for separering av det andre polymermateriale og/eller overflateaktivt stoff fra apolipoprotein A eller apolipoprotein E. I en særlig foretrukken utførelsesform har imidlertid det andre polymermateriale inverse oppløselighetskarakteristikaer og den vandige fase inneholdende det andre polymermateriale og hoveddelen av apolipoprotein A eller apolipoprotein E bringes til et separeringskar for ytterligere prosessering.

Selv om ulike fremgangsmåter er tilgjengelige for separering av det andre polymermateriale og/eller overflateaktive stoff fra apolipoprotein A eller apolipoprotein E, som angitt i

forrige avsnitt, vil foreliggende oppfinnelse i det følgende bli beskrevet i mer detalj med hensyn til temperaturindusert fase-separering med et annet polymermateriale med inverse oppløselighetskarakteristikaer.

5 I den særlig foretrukne utførelsesform utføres temperaturindusert fase-separering ved oppvarming av fasen inneholdende hoveddelen av apolipoprotein A eller apolipoprotein E til en temperatur som ligger høyere enn blakningspunktet for det andre polymermateriale med invers oppløselighet, men som  
10 ligger lavere enn temperaturen der degradering av apolipoprotein A eller apolipoprotein E skjer. Blakningspunktet eller fase-separeringstemperaturen er et karakteristisk trekk for polymerforbindelser med invers oppløselighet. Ved å heve temperaturen i en oppløsning inneholdende slikt polymermateriale  
15 over blakningspunktet blir således oppløsningen grumsete, på grunn av separering til to faser og utfelling av polymermateriale med invers oppløselighet. En annen fase-separering erholdes således der en polymerrik og vannrik fase dannes. Den vannrike fase er nesten uten polymerer, dvs. at den vanligvis inneholder  
20 mindre enn 1 % polymer. Den polymerrike fase danner også vanligvis bunnfasen etter oppvarming, ettersom tettheten til den polymerrike fase normalt er høyere enn den til den vannrike fase. Tettheter kan imidlertid reverseres ved hjelp av ulike manipuleringer, f.eks. tilsetning av kjemikalier slik som urea i  
25 ulike mengder. Apolipoprotein A eller apolipoprotein E er ofte nesten alltid avdelt til den vannrike fase, noe som reduserer nødvendigheten av ytterligere rensing av det aktuelle produkt.

For å muliggjøre teknisk og økonomisk anvendelse av polymermaterialer med invers oppløselighet må blakningspunktet  
30 være over frysepunktet til oppløsningen og lavere enn 100 °C. Ved foreliggende oppfinnelse kan blakningspunktet til det andre polymermateriale med invers oppløselighet være i området fra ca. 5 og til ca. 90 °C, vanligvis i området fra 10 til 35 °C. Blakningspunktet til den andre polymerforbindelse med invers  
35 oppløselighet ligger fortrinnsvis i området fra 15 til 60 °C, mer foretrukket i området fra 20 til 40 °C.

Temperaturen som det faseinneholdende andre polymermateriale må forhøyes til i den temperaturinduserte fase-separering kan reduseres ved utvelgelse av et andre polymert

materiale med et passe lavt blakningspunkt, noe som kommer frem fra det tidligere avsnitt. Temperaturen hvorved fasen inneholdende det andre polymermateriale må forhøyes til for å gjennomføre avdeling av det andre polymermateriale kan imidlertid reduseres også ved tilsetning av en liten mengde av et organisk eller mer vanlig uorganisk salt til denne fase. Blakningspunktet til UCON 50-HB-5100 er 50 °C i fravær av salt og kan således senkes til f.eks. 37 °C ved tilsetning av salt. Det er imidlertid ønsket at den temperaturinduserte fase-separering utføres i det vesentlige i fravær av salt, ettersom dette fremmer den etterfølgende rensing av apolipoprotein A eller apolipoprotein E.

Polymerforbindelser med invers oppløselighet og som er egnet for anvendelse som i andre polymermaterialer kan finnes i I.Y. Galaev et al, *Enzyme Microb. Tech.*, vol. 15 (1993), s. 354-366, som med dette er innført med referanse. Polymerforbindelser med invers oppløselighet og som er egnet for anvendelse i form av det andre polymermateriale, omfatter spesifikt polyalkylen-glykoler, poly(oksyalkylen)polymerer, poly(oksyalkylen)kopolymerer, polyvinylpyrrolidon, polyvinyl-alkohol, polyvinylkaprolaktam, polyvinylmetyleter, alkoksylerte stivelser, alkoksylert cellulose, alkylhydroksyalkylcellulose, silikonmodifiserte polymerer og derivater og blandinger derav. Egnede polyalkylen-glykoler omfatter polyetylenglykol, polypropylenglykol og derivater derav, slik som akryl- og metakrylsubstituert polyetylen- og -polypropylenglykol. Egnede alkylerte stivelser og alkoksylert cellulose omfatter metoksylerte og etoksylerte stivelser og cellulose. Egnede alkylhydroksyalkylcelluloser omfatter de celluloser der alkylgruppene har fra 1 til 4 karbonatomer. En foretrukken alkylhydroksyalkylcellulose er etylhydroksyetylcellulose (EHEC). Egnede poly(oksyalkylen)-kopolymerer omfatter tilfeldige og blokkopolymerer av etylenoksid og propylenoksid. Hydrofobisiteten til kopolymerene av etylenoksid og propylenoksid øker med økende propylenoksidinnhold. Innholdet av propylenoksid i kopolymeren av etylenoksid og propylenoksid ligger helst innen området fra ca. 30 til 90 vekt% av den totale vekt av kopolymeren, fortrinnsvis innen området fra 40 til 80 vekt%. Et spesifikt eksempel på en kopolymer av etylenoksid og propylenoksid som er egnet for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse er UCON 50-HB-5100

markedsført av Union Carbide, Corp., New York City, NY, USA. UCON 50-HB-5100 er en tilfeldig lineær, ikke-ionisk kopolymer satt sammen av 50 vekt% etylenoksid og 50 vekt% propylenoksid, med en molekylvekt ( $M_r$ ) på 4000 Da og et blakningspunkt på 50 °C. Et  
5 annet spesifikt eksempel på en tilfeldig kopolymer er satt sammen av 50 vekt% etylenoksid og 50 vekt% propylenoksid, denne er kalt Breox PAG 50A 1000 markedsført av International Speciality Chemicals Ltd. i Southampton, England. Breox PAG OA 1000 har en molekylvekt ( $M_r$ ) på 3900 Da og et blakningspunkt på 50 °C. Et  
10 annet eksempel på en kopolymer av etylenoksid og propylenoksid som er egnet for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse er EO<sub>30</sub>PO<sub>70</sub> som er en tilfeldig kopolymer satt sammen av 30 vekt% etylenoksid og 70 vekt% propylenoksid, med en molekylvekt ( $M_r$ ) på 3200 Da og et blakningspunkt på 38 °C. Enda et annet egnet  
15 eksempel er EO<sub>20</sub>PO<sub>80</sub> som er en tilfeldig kopolymer satt sammen av 20 vekt% etylenoksid og 80 vekt% propylenoksid, med en molekylvekt ( $M_r$ ) på 3300 Da og et blakningspunkt på 25 °C i en vandig oppløsning inneholdende 10 vekt% kopolymer. EO<sub>30</sub>PO<sub>70</sub> og EO<sub>20</sub>PO<sub>80</sub> er markedsført av Shearwater Polymers, Inc., Huntsville,  
20 AL, USA.

Japansk patentbeskrivelse med publikasjonsnummer JP 1994-228319 til Hidetoshi Tsuchida, beskriver ytterligere polymermaterialer med invers oppløselighet. Polymermaterialene omfatter blokkopolymere av propylenoksid og andre  
25 vannoppløselige polymerer med en molekylvekt som strekker seg fra 30000 Da. Hele innholdet i JP 1994-228319 er med dette innført med referanse i patentsøknaden.

Konsentrasjonen av målproduktet i den andre vandige oppløsning kan være i området fra ca. 0,1 til ca. 50 g/l av den  
30 andre vandige oppløsning, helst i området fra 0,5 til 20 g/l og fortrinnsvis i området fra 1 til 10 g/l.

I det temperaturinduserte fase-separasjonstrinn opprettholdes den mer hydrofobe fase fra den primært vandige separasjonstrinn over en tidsperiode som er tilstrekkelig for i  
35 det vesentlige å separere apolipoprotein A eller apolipoprotein E fra det andre polymermateriale. Denne tidsperiode kan være i området fra ca. 60 sekunder til ca. 5 timer, helst i området fra 5 minutter til 1 time og fortrinnsvis i området fra 10 minutter til 30 minutter. Tidsperioden krevet for fase-separering kan

imidlertid reduseres ved anvendelse av f.eks. sentrifugeseparering, sentrifugesentrifugering eller sentrifugedekantering, før apolipoprotein A eller apolipoprotein E tillates å separeres fra det andre polymermateriale. Dersom et slikt stoff anvendes kan  
5 tidsperioden for separering være i området fra ca. 5 sekunder til ca. 60 minutter og helst i området fra 10 sekunder til 30 minutter.

Foreliggende fremgangsmåte kan være kontinuerlig, f.eks. utført på en kolonne, eller satsvis.

10 Mange hydrofobe eller amfifile forbindelser kan også renses som beskrevet heri. Hydrofobe forbindelser er definert som forbindelser som er vannoppløselige eller lett oppløselige i vann i fravær av et overflateaktivt stoff. Amfifile forbindelser inneholder hydrofile, vannopp-løselige grupper og hydrofobe,  
15 vannoppløselige eller delvis vannoppløselige grupper.

Hydrofobisiteten kan måles som retensjonskoeffisienten til en hydrofob eller amfifil forbindelse, slik som et protein, ved hydrofob interaksjonskromatografi (HIC). Dette kan utføres ved anvendelse av kromatografibetingelsene beskrevet av Kischevarz  
20 and Nakai i Biochem. Biophys. Acta, vol. 576 (1979), s. 269-279. De anvendte kolonner var butyl- eller heksylepoksy "Sephacrose" 4B (diameter 16 mm, 200 mm i lengde) med likevekt og eluering i 2 mM natriumfosfatbuffer inneholdende 2 M natriumklorid ved pH 6,9. Elueringen ble utført med en strømningshastighet på 3 ml (timer x  
25 cm<sup>2</sup>) ved 22 °C. Ved anvendelse av de analytiske betingelser beskrevet av Kischevarz og Nakai (se ovenfor) kan den hydrofobe eller amfifile forbindelse ha en retensjonskoeffisient lik eller høyere enn 1, helst lik eller høyere enn 2, og fortrinnsvis lik eller høyere enn 3.

30 Hydrofobe og amfifile forbindelser omfatter også kjemisk, fysisk og/eller genetisk modifiserte hydrofile forbindelser som har hydrofobe eller amfifile karakteristika etter modifisering. Eksempler på kjemisk og/eller fysisk modifisering omfatter introduksjon av kovalent bundne hydrofobe  
35 grupper og denaturering av proteiner slik at proteinet blir i det vesentlige hydrofobt eller amfifilt. Etter forandring av karakteristikaene til de interne hydrofile forbindelser og anvendelse som beskrevet heri kan de hydrofobe eller amfifile målforbindelser gjøres hydrofile igjen.

Hydrofobe og amfifile forbindelser som kan anvendes med fordel omfatter polypeptider, lipider, lipopolysakkarider, steroider, membraner og kombinasjoner derav. Opprinnelsen til den hydrofobe eller amfifile forbindelse er irrelevant. Forbindelsene  
5 kan således avledes fra planter eller dyr eller de kan produseres innledningsvis ved hjelp av industrielle prosesser. Videre kan forbindelsene være av human eller animalsk opprinnelse eller produsert ved hjelp av rekombinante teknikker.

I foreliggende oppfinnelse refererer polypeptider seg  
10 til proteiner og oligopeptider med minst fem aminosyrer i kjeden. Antallet aminosyrer i polypeptidet fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse er helst innen området fra 10 til 4500 aminosyrer og fortrinnsvis i området fra 20 til 3000 aminosyrer. Polypeptidene kan være fullengde, dvs. at sekvensen av aminosyrer er identisk  
15 med den tilsvarende sekvens funnet i pattedyr generelt, og særlig hos mennesker. Polypeptidene kan også være delesjonsderivater av fullengdepolypeptidene der én eller flere aminosyrer er fraværende.

Foreliggende oppfinnelse kan med fordel anvendes for  
20 rensing av forbindelser som er til stede i ubehandlede fermenteringsbuljonger erholdt ved produksjon ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker. Ved foreliggende oppfinnelse kan fermenteringsbuljonger inneholde ekstracellulære og/eller intracellulære produkter, slik som proteiner, så vel som  
25 celleetterlatenskaper, slik som cellene fra utgangsorganismer og/eller cellefragmenter. Foreliggende oppfinnelse kan også med fordel anvendes for rensning av fermenteringsbuljonger som har vært forbehandlet, f.eks. ved sentrifugering, filtrering, ultrafiltrering eller flokkulering, for fjerning av alle eller i  
30 det vesentlige alle celleetterlatenskaper.

Foreliggende oppfinnelse anvendes hovedsakelig for rensing av enhver apolipoprotein A (ApoA) eller apolipoprotein E (ApoE), eller varianter eller blandinger derav. Foreliggende oppfinnelse kan anvendes på ApoA eller ApoE erholdt fra plasma,  
35 helst humant plasma eller produsert ved hjelp av en rekombinant DNA-teknikk, helst i gram-negative bakterier og fortrinnsvis i *E. coli*. ApoA eller ApoE kan være urenset, eller i det vesentlige urenset eller forbehandlet før anvendelse av foreliggende

oppfinnelse. Eksempler på forbehandling er diafiltrering, ultrafiltreringsutfelling og ulike typer kromatografi.

I foreliggende oppfinnelse omfatter begrepene ApoA og ApoE enhver preform eller fragment eller enhver trunkert, utvidet eller mutert form eller enhver blanding av enhver av disse former eller fragmenter. Preform omfatter for eksempel aminosyre 249 Met-formen av ApoA-I som beskrevet i WO-A-88/03166 til Sirtori et al. Andre preformer er proapolipoprotein A-I'er beskrevet i US-A-5059528 til UCB i tillegg til EP-A-308336, JP 216988/1984 og JP 252048/1978 alle til Mitsubishi Chem. Ind. Fragmenter som er relatert til en del ApoA eller ApoE inneholdende minst én  $\alpha$ -heliks, f.eks. som beskrevet i WO-A-93/25581 til Innogenetics S.A. i Belgia. Trunkerte og utvidede former relatert til ApoA og ApoE-molekyler hvor én eller flere aminosyrer er henholdsvis fraværende eller er blitt tilsatt i den N og/eller C-terminale ende av molekylerne. Helst fra to til åtte aminosyrer er fraværende eller er blitt tilsatt, fortrinnsvis fra 3 til 6 aminosyrer. Muterte former i forbindelse med ApoA- og ApoE-molekyler der én eller flere aminosyrer er blitt utbyttet med en annen aminosyre, f.eks. ApoA-IM som beskrevet i WO-A-93/12143 og WO-A-94/13819. Andre muterte former er ApoA-ISeattle (Deeb et al (1991) J. Bio. Chem. 266:13654-13660), ApoA-IYame (Takada et al(1991) J. Lipid Res. 32:1275 ff) og videre en mutert form av ApoA-I uten navn (Matsunaga et al (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2793-2797).

Humant ApoE og varianter derav er beskrevet i "Human Apolipoprotein Mutants III", utg. av C.R. Sirtori et al (1993) Nato ASI Serier, Springer Forlag, Berlin, II 73:81-96.

Kjente ApoA'er er f.eks. ApoA-I, ApoA-II og ApoA-IV, i foreliggende oppfinnelse er ApoA helst ApoA-I, eller varianter eller blandinger derav. Naturlig plasma ApoA-I er en enkel polypeptidkjede på 243 aminosyrer, der den primære sekvens er kjent (Brewer et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:623-630). ApoA er helst en mutert form av ApoA-I hvor minst én Cys-rest er byttet ut med en annen aminosyrerest, fortrinnsvis en Arg-rest, noe som gjør dannelse av disulfidbundet dimer mulig. I aminosyresekvensen til naturlig humant ApoA-I er Arg-restene lokalisert i posisjonene 10, 27, 61, 83, 116, 123, 131, 149, 151, 153, 160, 171, 273, 137, 108 og 215. Substitusjoner er blant

disse foretrukket i én eller flere av posisjonene 160, 171, 173, 177 og 188, dvs. i posisjoner innen samme  $\alpha$ -heliks. Mer foretrukket er det at Arg-restene er byttet ut i posisjonene 171 og/eller 173. Mest foretrukket ApoA-I, er ApoA-IM.

5 Humant apolipoprotein A-IMilano (ApoA-IM) er en naturlig forekommende mutert form av normal ApoA-I (Weisgraber et al. (1980) J. Clin. Invest. 66:901-907). I ApoA-IM har én rest av aminosyren arginin (Arg 173) blitt byttet ut med en rest i aminosyren cystein (Cys 173). Ettersom ApoA-IM inneholder én  
10 cysteinrest per polypeptidkjede kan denne eksistere som en monomer eller i form av en disulfidbundet dimer. Molekylvekten til monomeren er ca. 28000 Da og for dimeren ca. 56000 Da. Disse tre former er kjemisk ombyttbare og begrepet ApoA-IM diskriminerer ikke, i foreliggende sammenheng mellom de to  
15 former.

Apo A-IM er et protein inneholdende minst seks hoved  $\alpha$ -helikssegmenter og har en meget tett struktur. Flere av  $\alpha$ -heliksene av amfifile, noe som danner et amfifilt protein der én overflate er hydrofob og den andre er hydrofil (D. Eisenberg  
20 et al, Nature, vol. 299 (1982), s. 371-374). De amfifile egenskaper til ApoA-IM og andre ApoA'er danner en tendens til å danne micellestrukturer med andre proteiner og lipider i vandige oppløsninger.

For å muliggjøre produksjon av tilstrekkelige mengder  
25 ApoA-I generelt og mer spesifikt ApoA-IM gjøres det anvendelse av rekombinante DNA-teknikker, f.eks. *E. coli*. Rekombinant fremstilling og anvendelse av ApoA-IM, monomerer såvel som dimerer, er således beskrevet i patentbeskrivelsene i WO-A-88/03166 til Farmitalia Carlo Erba (FICE), WO-A-90/12879 til  
30 Sirtori et al, så vel som WO-A-93/12143 og WO-A-94/13819 begge til Pharmacia & Upjohn AB (tidligere Kabi Pharmacia AB).

Prosentverdier og deler er angitt i vekt, med mindre annet er angitt.

### 35 Eksperimenter

#### Materialer

Rekombinant apolipoprotein A-IM ble produsert i *E. coli* av Pharmacia & Upjohn AB i Stockholm, Sverige. Cellene ble separert og filtratet ble konsentrert 4 ganger ved hjelp av

ultrafiltrering ved hjelp av filtrering ved anvendelse av en membran med en ekskludering ved 10000 Da. Konsentrasjonen av Apo A-IM og den totale proteinkonsentrasjon etter ultrafiltrering var henholdsvis 3,5/ml og 35 mg/ml. Dette materiale ble anvendt som  
5 utgangsmateriale i Eksemplene 1-4.

Polymerene i bunnfasen var to hydroksypropylstivelsespolymerer, Reppal PES 100 og Reppal PES 200, begge erholdt fra Carbamyl AB i Kristianstad, Sverige og én hydroksyetylstivelsespolymer, Solfarex A85, erholdt fra AVEBE i Vendum,  
10 Nederland. Reppal PES 100 og Reppal PES 200 hadde en molekylvekt ( $M_r$ ) på henholdsvis 100000 og 200000, og ble anvendt i ren, tørr form ved fremstilling av tofasesystemene. Solfarex A85 hadde en uidentifisert, men høyere molekylvekt enn Reppal PES 200. En 50 % (vekt/vekt) stokkløsning av Solfarex A85 ble oppvarmet til 80-90  
15 °C for oppløsning av den hydrofile polymer før fremstilling av tofasesystemene.

Toppfasepolymeren Breox PAG50A 1000 ( $M_r$  3200) ble erholdt fra International Speciality Chemicals Ltd. fra Southampton, England. Breox PAG50A 1000 har en molekylvekt ( $M_r$ )  
20 på 3900 DA og et blakningspunkt på 50 °C. Breox PAG50A 1000 ble anvendt i ren, tørr form ved fremstilling av tofasesystemene.

Den totale vekt av de primære tofasesystemer var 5 g. 3,75 g av utgangsproteinoppløsningen ble tilsatt til systemet, når Reppal PES 100 ble anvendt som bunnfasepolymer. Når Solfarex  
25 A85 ble anvendt som bunnfasepolymer var mengden proteinoppløsning tilsatt til systemene 3,35 g.

"Triton X-100" ble erholdt fra Boehringer Mannheim i Mannheim, Tyskland. "Triton X-100" er et ikke ionisk overflateaktivt stoff med et blakningspunkt på 65 °C og en CMC på  
30  $3,1 \times 10^{-4}$  mol/l. "Tween 20" og "Tween 80" ble erholdt fra Sigma Chemicals Co. fra Saint Louis, MO, USA. "Tween 20" er et ikke-ionisk overflateaktivt stoff med et blakningspunkt på 76 °C og en CMC på  $5,9 \times 10^{-5}$  mol/l. "Tween 80" er et ikke-ionisk overflateaktivt stoff med et blakningspunkt på 65 °C og CMC på  
35  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/l.

Alle kjemikalier hadde analytisk reagensrenhet.

Analytiske metoder og beregninger

Det totale proteininnhold ble bestemt ifølge Bradford, Anal. Biochem., vol. 72 (1976) s. 248-254 ved anvendelse av Coomassie Brilliant Blå G. Absorpsjonen ble målt ved 595 og 465 nm og absorpsjonen erholdt ved 465 nm ble trukket fra absorpsjonen erholdt ved 595 nm. Bovint serumalbumin ble anvendt som standard.

Rensingen av Apo A-IM i toppfasene ble analysert på Phast gelelektroforese, 20 % SDS-PAGE (Pharmacia & Upjohn AB, Uppsala, Sverige). Gelene ble farget med coomassieblått og skannet med et densitometer (Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Ved hjelp av densitometeret kunne prosentandelen av Apo A-IM i den totale proteinkonsentrasjon bestemmes. Denne verdi ble anvendt for å beregne graden av renhet:

$$\text{Grad av renhet} = P_{\text{Apo}}^s / P_{\text{Apo}} \quad (3)$$

hvor

$P_{\text{Apo}}^s$  = prosent Apo A-IM av totalt protein i prøven  
 $P_{\text{Apo}}$  = prosent Apo A-IM av totalt protein i utgangsmaterialet

Topp høyden ble anvendt for å beregne utbyttet. Justeringer i volumforandring og fortynningen av prøvene ble gjort.

$$\text{Utbytte} = \frac{(\text{topphøyde} \times V^t \times \text{fortynning})_{\text{prøve}}}{(\text{topphøyde} \times V \times \text{fortynning})_{\text{utgangsmateriale}} \times 100} \quad (4)$$

hvor

$V^t$  = volum av den vannrike toppfase etter avsluttende separering

$V$  = volum av utgangsmaterialet tilsatt til tofasesystemet.

Utbyttet av Apo A-IM kan også beregnes som:

$$\text{Utbytte} = (C_{\text{Apo}}^t \cdot V^t) / (C_{\text{Apo}} \cdot V) \times 100 \quad (5)$$

hvor

$C_{\text{Apo}}^t$  = konsentrasjon av Apo A-IM i den vannrike  
toppfase etter avsluttende separering

$C_{\text{Apo}}$  = konsentrasjon av Apo A-IM i utgangsmaterialet

$V^t$  = volum av den vannrike toppfase etter avsluttende  
separering og

$V$  = volum av utgangsmaterialet tilsatt  
tofasesystemet.

Graden av rensing av Apo A-IM i systemene kan også  
beregnes som:

$$\text{Grad av rensing} = (C_{\text{Apo}}^t / C^t) / (C_{\text{Apo}} / C) \quad (6)$$

hvor

$C_{\text{Apo}}^t$  = konsentrasjon av Apo A-IM i den vannrike toppfase etter  
avsluttende separering

$C_{\text{Apo}}$  = konsentrasjon av Apo A-IM i utgangsmaterialet

$C^t$  = total proteinkonsentrasjon i den vannrike  
toppfase etter avsluttet separering og

$C$  = total proteinkonsentrasjon i  
utgangsmaterialet.

Polymerkonsentrasjonene ble beregnet som % vekt/vekt  
(w/w).

I forsøkene med resirkulering av toppfasekopolymer og  
overflateaktivt stoff ble toppfasen fra det primære system  
fjernet etter fase-separering og veid. Etter terminal separering  
ble fasene isolert og veid på ny. Toppfasene ble analysert med  
hensyn til "Triton X-100"-innhold ved maling av absorpsjon ved  
275 nm. Breox PAG50A 1000-konsentrasjon ble beregnet ved måling  
av brytningsindeksen og delen som kom fra "Triton X-100" ble  
trukket fra. På denne måte kunne gjenvinningen av polymeren og  
det overflateaktive stoff beregnes.

#### Eksempel 1

Virkningen på renhet og utbytte av primært vandig  
tofaseseparering etterfulgt av temperaturindusert fase-separering  
ble undersøkt ved anvendelse av Apo A-IM som målprotein. Etter

fjerning ble en *E. coli* fermenteringsoppløsning inneholdende Apo A-IM tilsatt en vandig oppløsning inneholdende Reppal PES 100, Breox PAG50A 1000 og "Triton x 100". Den resulterende primært vandige oppløsning inneholdende 8 % Reppal PES 100, 16 % Breox PAG50A 1000 og 0 til 4,0 % (vekt/vekt) "Triton X-100" ble blandet med en magnetisk omrører. Temperaturen i den primært vandige oppløsning var 22 °C. Separeringen til to faser ble forsterket ved sentrifugering ved 1360 g i 10 minutter. Etter fase-separering i det primært vandige system ble temperaturindusert fase-separering utført ved å opprettholde den isolerte toppfase ved 60 °C i 30 minutter.

"Triton X-100" ble avdelt primært til toppfasen, avdelingskoeffisienten  $K$  var 5,5, som beregnet ifølge formel (1), ved en konsentrasjon av overflateaktivt stoff på 1,0 % (vekt/vekt).

Graden av renhet og utbytte av Apo A-IM etter separering fra Reppal PES 100 i det primært vandige tofasetrinn, og fra Breox PAG50A 1000 og "Triton X-100" i den temperaturinduserte fase-separering vises i Tabell I. Graden av rensing og utbytte ble bestemt ved hjelp av gelskanning med densitometer.

Tabell I

Effekt av konsentrasjon av overflateaktivt stoff i et primært vandig tofasetrinn på utbytte og rensing av Apo A-IM etter et etterfølgende avslutende separasjonstrinn

Test	Overflate-aktivt stoff kons. (%)	Renhetsgrad	Utbytte (%)
Sammenligning	0,0	1,4	8
1	0,25	6,7	69
2	0,5	6,8	77
3	1,0	6,7	88
4	2,0	5,7	91
5	4,0	5,5	88

Som det kommer frem av Tabell I forbedrer anvendelse av et preparat inneholdende et overflateaktivt stoff og et første og et andre polymermateriale i det primært vandige tofasetrinn, dramatisk resulterende utbytte og renhet av Apo A-IM etter et etterfølgende terminalt separasjonstrinn som sammenlignet med det sammenlignende forsøk der det overflateaktive stoff var fraværende i det primært vandige tofasetrinn.

### Eksempel 2

Fremgangsmåten ifølge Eksempel 1 ble gjentatt med den forskjellen at to hydrofile polymermaterialer og tre ulike overflateaktive stoffer, med varierende konsentrasjoner ble anvendt. Den primært vandige tofaseoppløsning inneholdt 8 % Reppal PES 100 eller 8 % Solfarex A85, 16 % Breox PAG 50A 1000 og 1,0% "Triton X-100", 2,0 % "Tween 80" eller 2,0 % "Tween 20". Resultatene er vist i Tabell II.

Tabell II

Virkingen av overflateaktivt stoff og bunnfasepolymer på utbytte og rensingen av Apo A-1M etter et etterfølgende avsluttende separeringstrinn

Overflate-aktivt stoff og kons. (%)	Reppal PES 100	Reppal PES 100	Solfarex A85	Solfarex A85
	Renhetsgrad	Utbytte (%)	Renhetsgrad	Utbytte (%)
"Triton X-100" 1,0 %	7,2	85	7,0	77
"Tween 80" 20 %	7,5	54	5,5	45
"Tween 20" 2,0 %	7,4	40	6,5	54

Som det kommer frem av Tabell II kan anvendelse av forbindelsene ifølge oppfinnelsen, inneholdende ulike

overflateaktive stoffer og konsentrasjoner og ulike første polymermaterialer, anvendes for å forbedre det resulterende utbytte og renhet av Apo A-IM etter et etterfølgende avslutende separasjonstrinn.

5

### Eksempel 3

Virkingen av overflateaktivt stoff på avdelingskoeffisienten, K, og fordelingsforholdet, G, for Apo A-IM og totalt protein i et primært vandig tofasetrinn ble  
10 undersøkt i en primært vandig oppløsning inneholdende henholdsvis 6 % Reppal PES 100 og 12 % Breox PAG50A 1000, i kombinasjon med 1 % "Triton X-100", 2 % "Tween 80" eller uten overflateaktivt stoff for sammenligning.

Fyll-*E. coli*-proteinene var kraftig avdelt til  
15 bunnfasen i alle tre systemer. I systemene med overflateaktivt stoff var Apo A-IM avdelt til toppfasen. Avdelingskoeffisienten, K, og fordelingsgraden, G, for Apo A-IM og totalt protein beregnet ifølge formlene (1) og (2) og basert på ELISA-resultater er vist i Tabell III.

20

25

30

35

TABELL III

Virkingen av overflateaktivt stoff på avdelingskoeffisienten,  $K$ , og fordelingsgraden,  $G$ , for Apo A-IM og totalt protein i et primært vandig tofasetrinn

Over- flate- aktivt stoff og kons. (%)	$V_{\text{Topp}}/$ $V_{\text{Bunn}}$	$K_{\text{protein}}$	$G_{\text{protein}}$	$K_{\text{Apo A-IM}}$	$G_{\text{Apo A-IM}}$
----- 0 %	6,0	0,07	0,39	1	6
"Triton X-100" 1,0 %	4,1	0,11	0,49	7	29
"Tween 80" 2,0 %	4,5	0,10	0,50	4	18

Som det kommer frem fra Tabell III er avdelingskoeffisienten,  $K$ , og fordelingsgraden,  $G$ , dramatisk øket for målforbindelsen Apo A-IM når et overflateaktivt stoff er til stede i den primært vandige oppløsning.

#### Eksempel 4

Innvirkningen av vandig tofaseseparering med et overflateaktivt stoff etterfulgt av et avslutende separasjonstrinn på fjerning av forurensende nukleinsyrer ble studert ved anvendelse av Apo A-IM som målprotein. Fremgangsmåten ifølge Eksempel 2 ble gjentatt med 6 % Reppal PES 100, 12 % Breox PAG50A 1000 og 2 % "Tween 80". Resultatene er vist i Tabell IV.

TABELL IV

Virkingen av et vandig tofasetrinn med et  
overflateaktivt stoff etterfulgt av et  
5 avslutende separasjonstrinn på fjerning av DNA.

Prøve	DNA kons. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Grad av DNA- fjerning
Utgangsmateriale	2,1	-----
Vannrik toppfase etter avslutende separering	< 0,002	> 1000

Som det kommer fra Tabell IV var den resulterende DNA-  
konsentrasjon i den endelig protein-inneholdende vannfase  
10 redusert mer enn 1000 ganger sammenlignet med utgangsmaterialet.

#### Eksempel 5

Virkingen av resirkulering av overflateaktivt stoff og  
toppfasepolymer etter temperaturindusert fase-separering ble  
15 undersøkt ved anvendelse av Apo A-IM som målforbindelse.  
Fremgangsmåtesekvensen, deriblant resirkulering er skjematisk  
vist i Fig. 1. Fremgangsmåten ifølge Fig. 1 ble repetert med en  
forskjell at det proteininneholdende utgangsmateriale inneholdt  
0,9 mg/ml Apo A-IM og 7 mg/ml totalt protein. Videre inneholdt  
20 den primært vandige tofaseoppløsning 17 % Reppal PES 200, 12 %  
Breox PAG50A 1000 og 1 % "Triton X-100". Den nedre fase, erholdt  
etter temperaturindusert fase-separering inneholdende "Breox  
PAG50A 1000 og "Triton X-100" ble separert fra den øvre fase  
inneholdende Apo A-IM. Oppløsningen inneholdende Breox PAG50A  
25 1000 og "Triton X-100" ble resirkulert til det primært vandige  
tofasesystem. Konsentrasjonen av Breox PAG50A 100 og "Triton X-  
100" i den resirkulerte oppløsning var henholdsvis 55 %  
(vekt/vekt) og 4,9 % (vekt/vekt). Det primært vandige  
tofasesystem ble fremstilt fra en ny proteinstartoppløsning ved  
30 tilsetning av ca. 10-15 % av den opprinnelige mengde Breox PAG50A

1000 og "Triton X-100" for å erstatte tapet i hver syklus. Bunnfasepolymeren besto av 100 % fersk Reppal PES 200 i hver syklus.

Den gjennomsnittlige utvinning av Breox PAG50A 1000 og "Triton-100" i hver syklus var henholdsvis 83 % og 88 %.

Avdelingen av "Triton X-100" ble bestemt etter temperaturindusert fase separering ved 60 °C. "Triton X-100" avdelte kraftig til den kopolymer-inneholdende bunnfase med en avdelingskoeffisient, K, på 0,004. Toppfasen, inneholdende i det vesentlige vann og protein, inneholdt 0,02 % "Triton X-100" som målt ved spektrofotometri. Den kopolymer-overflateaktive stoffase beholdt etter oppvarming til 60 °C hadde en konsentrasjon på 55 % Breox 50A1000 og 4,9 % "Triton X-100".

Når prøver fra den kopolymer-overflateaktive stoffasen ble analysert med SDS-PAGE og farget med sølvnitrat kunne ikke noe protein påvises, dvs. intet påviselig Apo A-IM var gått tapt i den resirkulerte fase selv etter resirkulering minst tre ganger.

Renhetsgraden og utbytte av Apo A-IM etter temperaturindusert fase separering kommer frem i Tabell V. Renhetsgraden og utbytte ble beregnet ifølge formlene (5) og (6) basert på ELISA-resultater.

25

30

35

TABELL V

5 Virkningen av resirkulering av overflateaktivt stoff og andre polymermateriale på utbytte og renheten av Apo A-IM i et vandig tofasetrinn etterfulgt av et avslutende separasjonstrinn

Antall ganger med resirkulering	Renhetsgrad	Utbytte .(%)
0	4,2	76
1	4,6	74
2	4,5	72
3	4,5	76

10 Som det kommer frem i Tabell V var renhetsgraden og utbytte av Apo A-IM i systemene med resirkulert toppfasepolymer og overflateaktivt stoff lik det innledningsvise vandige tofasesystem med nye polymerer og overflateaktivt stoff.

#### Eksempel 6

15 Virkningen av resirkulering av overflateaktivt stoff og toppfasepolymer etter temperaturindusert faseseparering ble undersøkt ved anvendelse av Apo A-IM som målforbindelse. Fremgangsmåten ifølge Eksempel 5 ble gjentatt med den forskjell av  $EO_{30}PO_{70}$  ble anvendt som andre polymermateriale istedenfor  
20 Breox PAG50A 1000. Samme konsentrasjoner av polymerer og overflateaktivt stoff ble anvendt, konsentrasjonen av  $EO_{30}PO_{70}$  og "Triton X 100" i den resirkulerte oppløsning var hhv. 80 % (vekt/vekt) og 6,3 % (vekt/vekt). Renhetsgraden og utbytte av Apo A-IM etter temperaturindusert faseseparering kommer frem i Tabell  
25 VI. Renhetsgraden og utbytte ble beregnet ifølge formlene (5) og (6) basert på ELISA-resultater.

TABELL VI

Virkingen av resirkulering av overflateaktivt stoff og andre polymermateriale på utbytte og rensing av Apo A-IM i et vandig tofasetrinn etterfulgt av et avslutende separasjonstrinn.

5

Antall ganger med resirkulering	Renhetsgrad	Utbytte (%)
0	5,4	76
1	4,8	53
2	5,5	74
3	4,6	54

Som det kommer frem i Tabell VI kan renhetsgraden og utbytte av Apo A-IM i systemene med resirkulert toppfasepolymer og overflateaktivt stoff være lik det innledningsvise vandige tofasesystem med nye polymerer og overflateaktivt stoff.

10

P a t e n t k r a v

- 5 1. Fremgangsmåte for rensing av apolipoprotein A eller  
apolipoprotein E,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter  
a) blanding, i tilfeldig rekkefølge, av et utgangsmateriale  
inneholdende apolipoprotein, et første polymermateriale som er  
10 hydrofilt, vann, et andre amfifilt polymert materiale og et  
overflateaktivt stoff, hvor det første polymermateriale og det  
andre polymermateriale ikke er blandbare i den resulterende  
primært vandige oppløsning, og;  
b) opprettholdelse av den primært vandige oppløsning over en  
15 tidsperiode som er tilstrekkelig for i det vesentlige å separere  
de dannede faser;  
c) fjerning av en fase inneholdende hoveddelen av  
apolipoproteinet og det andre polymermateriale og/eller det  
overflateaktive stoff;  
20 d) separering av apolipoproteinet fra det andre polymermateriale  
og det overflateaktive stoff ved en temperatur som induserer  
separering; og deretter  
e) resirkulering av det separerte, andre polymermateriale og det  
overflateaktive stoff til det innledningsvise blandingstrinn (a).

- 25 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det første polymer-  
materiale er utvalgt fra gruppen bestående av hydroksyalkyl-  
cellulose, hydroksyalkylstivelser, stivelse, dekstran, pullulan  
30 og blandinger derav.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at hydroksyalkylstivelsen er  
utvalgt fra gruppen bestående av hydroksymetylstivelse, hydroksy-  
35 etylstivelse, hydroksypropylstivelse og hydroksybutylstivelse og  
blandinger derav.

4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at molekylvekten til det første polymermateriale er i området fra 5 000 opp til 5 000 000 Da, helst i området fra 40 000 til 500 000 Da.

5 5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det andre polymermateriale har et blakningspunkt i området fra 5 til 90 °C, fortrinnsvis i området fra 15 til 60 °C.

10 6. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at det andre polymermateriale er utvalgt fra gruppen bestående av polyalkylenglykoler, poly(oksyalkylen)polymerer, poly(oksyalkylen)kopolymerer, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, polyvinylkaprolaktam, 15 polyvinylmetyleter, alkoksylerte stivelser, alkoksylert cellulose, alkylhydroksylcellulose, silikonmodifiserte polyetere og blandinger derav.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at poly(oksyalkylen)-kopolymeren er en tilfeldig eller blokkopolymer av etylenoksid og propylenoksid.

8. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at innholdet av propylenoksid i kopolymeren ligger i området fra 30 til 90 vekt% av den totale vekt av kopolymeren, fortrinnsvis innen området fra 40 til 80 vekt%.

30 9. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at apolipoproteinet separeres fra det andre polymermateriale og det overflateaktive stoff ved oppvarming av den fjernede fase til en temperatur som ligger lavere enn temperaturen der degradering av apolipoproteinet 35 skjer, men som ligger høyere enn blakningspunktet til det andre polymermateriale og det overflateaktive stoff for utfelling av det andre polymermateriale og det overflateaktive stoff, og deretter separering av fasen inneholdende det utfelte andre

polymermateriale og overflateaktive stoff fra fasen inneholdende apolipoproteinet.

10. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,  
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av det første polymermateriale i den primært vandige oppløsning ligger i området fra 1 til 30 vekt% av den totale vekt av den primært vandige oppløsning, helst innen området fra 3 til 20 vekt%.
- 10 11. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av det andre polymermateriale i den primært vandige oppløsning er i området fra 0,5 til 30 vekt% av den totale vekt av den primært vandige oppløsning, helst innen området fra 3 til 20 vekt%.
- 15 12. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av apolipoprotein i den primært vandige oppløsning er i området fra 0,1 til 50 g/l av den primært vandige oppløsning, fortrinnsvis i  
20 området fra 1 til 10 g/l.
13. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det overflateaktive stoff er utvalgt fra gruppen bestående av ikke-ioniske overflateaktive  
25 stoffer, anioniske overflateaktive stoffer og kationiske overflateaktive stoffer.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ikke-ioniske  
30 overflateaktive stoff er utvalgt fra gruppen bestående av alkyletoksylater, polyoksyetylenorbitanfettsyreestere, blokkopolymerer, polyoksyetylenalkyletere, polyglykoletere og alkylglykosider.
- 35 15. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av det overflateaktive stoff i den primært vandige oppløsning er høyere enn den kritiske micellekonsentrasjon (CMC).

16. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, karakterisert ved at minst 60 % av den innledningsvise mengde av det andre polymermateriale og det overflateaktive stoff, resirkuleres til det innledningsvise s blandingstrinn, fortrinnsvis minst 80 %.
17. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, karakterisert ved at ApoA eller ApoE produseres ved hjelp av rekombinant DNA-teknikk.
- 10 18. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, karakterisert ved at ApoA eller ApoE erholdes fra humant plasma.
- 15 19. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav, karakterisert ved at ApoA er ApoA-I eller blandinger derav.
- 20 20. Fremgangsmåte ifølge krav 19, karakterisert ved at ApoA-I er ApoA-IMilano.

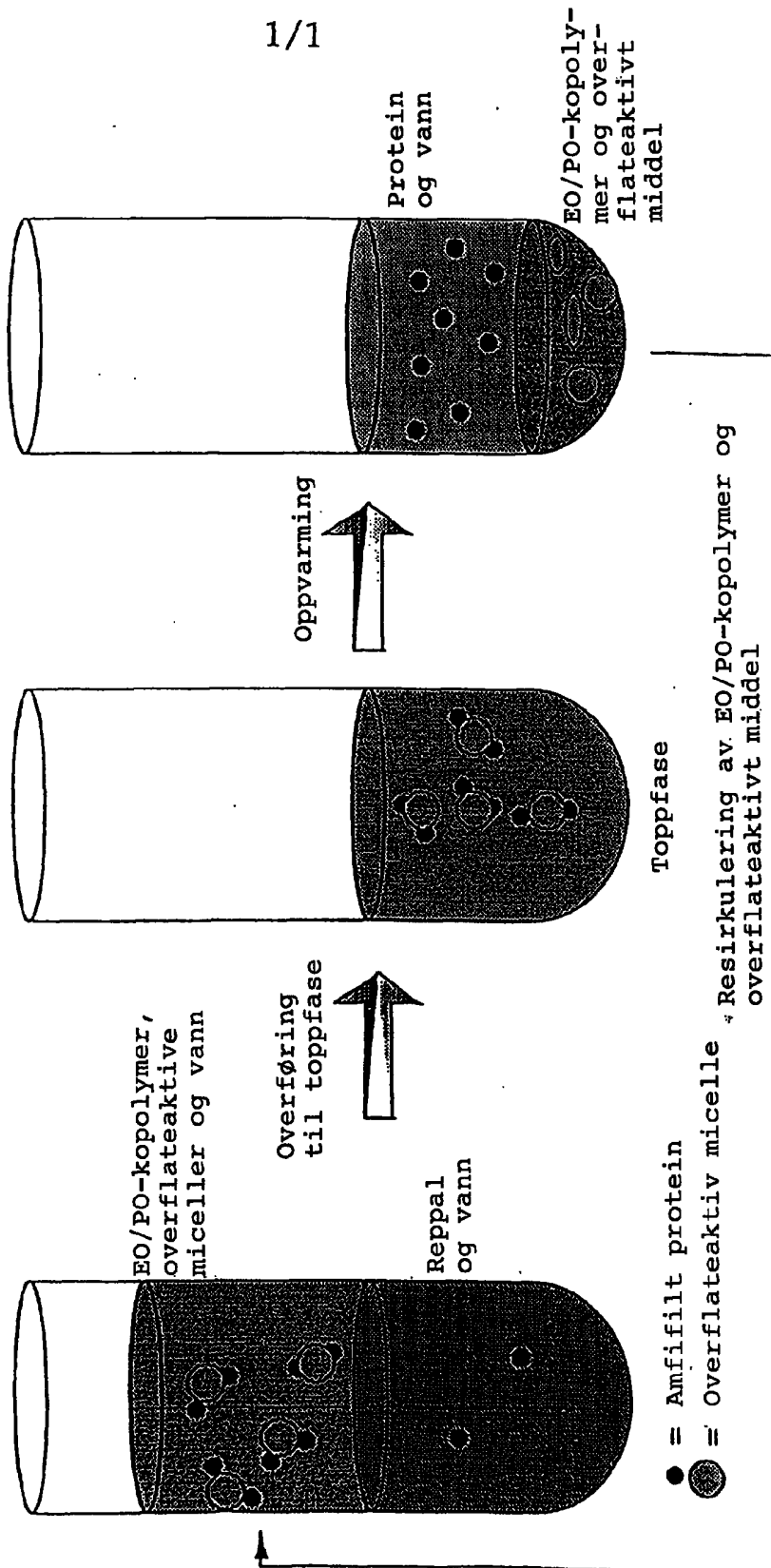


Fig. 1