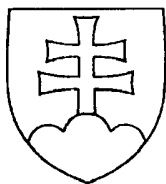


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

(22) Dátum podania: 20.02.95

(31) Číslo prioritnej prihlášky: P 44 06 515.9

(32) Dátum priority: 28.02.94

(33) Krajina priority: DE

(43) Dátum zverejnenia: ~~09.08.1995~~ 13. sept. 1995

(86) Číslo PCT:

(21) Číslo dokumentu:

226-95

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/435,

C 07 K 1/18,

1/22,

3/20

(71) Prihlasovateľ: Immuno Aktiengesellschaft, Wien, AT;

(72) Pôvodca vynálezu: Fischer Bernhard Dr., Wien, AT;
Mitterer Artur Dr., Orth/Donau, AT;
Dorner Friedrich prof. Dr., Wien, AT;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob izolácie a purifikácie proteínov závislých od vitamínu K**

(57) Anotácia:
Na separáciu proteínov sa opisuje metóda, vyznačujúca sa tým, že používa aniónovú výmennú chromatografiu a voliteľne afinitnú chromatografiu. Metóda je vhodná najmä na purifikáciu Faktorov II, VII, IX, X a Proteínu S, Proteínu C a Proteínu Z. Pomocou tejto metódy sú získané proteíny závislé do vitamínu K v predkladanej 95 % čistote.

Spôsob izolácie a purifikácie závislých od vitamínu K proteínov

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu izolácie a purifikácie proteínov závislých od vitamínu K.

Doterajší stav techniky

S odhliadnutím od prírodne sa vyskytujúcich proteínov je dnes možné pri prispení metód génových technológií produkovať cicavčie, a najmä potom ľudské, proteíny rekombinantnými technikami. Pre tento účel sú hostiteľské bunky transformované alebo transfektované cudzou DNA a kultivované, čím je v prípade hostiteľských eukaryotických buniek rekombinantne produkovaný proteín uvoľňovaný v rozpustnej forme do média buniek [R.G. Werener and W. Berthold. Drug Res. 38, 422-428 (1988)]. Napriek tomu, keďže hostiteľské bunky tiež uvoľňujú spolu s požadovanými rekombinantnými proteínmi ďalšie nežiadúce proteíny, je nevyhnutné obohatiť a/alebo izolovať požadované proteíny v jednom alebo viacerých krokoch. V súvislosti s tým sú nutné metódy, ktoré efektívne a selektívne umožňujú izoláciu rekombinantných proteínov z bunkového média.

Zvyčajne sú na purifikáciu rekombinantných proteínov používané fyzikálne a chemické vlastnosti proteínov. Takými vlastnosťami sú veľkosť proteínov, prirodzený náboj povrchu, ich hydrofilita a rozpustnosť. Doplnkové purifikačné metódy súvisia s väzbami, ktoré proteíny tvoria s ďalšími molekulami, ako napríklad s protilátkami. Rovnaké prístupy sú aj pre purifikáciu proteínov z prirodzených zdrojov. Tiež tieto, ako oddelenie rovnako sa vyskytujúcich proteínov od zvyšných sprevádzajúcich proteínov, sú založené na fyzikálnych a chemických vlastnostiach proteínov.

Proteíny závislé od vitamínu K boli doteraz purifikované

podľa takých metód ako je proteínová precipitácia, iónová výmenná chromatografia a gelová filtrácia [A.L. Bloom and D.P. Thomas, *Haemostasis and Thrombosis*, Churchill Livingstone, New York (1987)]. B. Dahlbäck [Biochem. J. 209. 837-846 (1983)] popísal purifikačnú metódu pre proteín S (PS). Po bárium citrátovej precipitácii je PS izolovaný na DEAE-Sephacel. J. Malm et al [Eur. J. Biochem. 187, 737-743 (1990)] purifikoval rekombinantný PS (rPS) afinitnou chromatografiou na monoklonálnu protilátku. Faktor IX (FaIX) bol izolovaný B. Osterudom a R. Flengstrudom [Biochem. J. 145, 496-474 (1975)] bárium suflátovou precipitáciou a iónovou výmennou chromatografiou na celulóze. Monoklonálne protilátky boli využité H. Kinom et al [Sem. Hematol. 28 Suppl. 6 15-19 (1991)] pre purifikáciu FaIX.

US 5,055,557 popisuje metódu na purifikáciu a koncentráciu proteínov závislých od vitamínu K z plazmy rovnako ako na purifikáciu a koncentráciu rekombinantne produkovaných proteínov pomocou imunoabsorbentu použitím monoklonálnej protilátky

Pri vyššie uvedených metódach musíme venovať pozornosť faktu, že vlastnosti mnohých proteínov nie sú vzájomne dostatočne odlišné, čo robí ich frakcionáciu (oddelenie) veľmi obtiažnou. Preto je nevyhnutné, aby sa používali kombinácie metód a koordinovali purifikačné kroky, aby sme obdržali optimálne výhodné rozdiely vo vlastnostiach proteínov.

Mnoho proteínov prirodzene sa vyskytujúcich v ľudskej a živočíšnej krvi môže viazať dvojväzbové katióny. Takéto proteíny sú syntetizované bunkou v procese závislom od vitamínu K, čím vznikajú miesta viažúce katióny premenou kyseliny glutámovej (Glu) na kyselinu τ -karboxyglutámovú (Gla). Tieto miesta viažúce katióny môžu potom byť vysýtené vápenatými iónmi (Ca^{2+}). Okrem vápenatých iónov sú tieto

miesta viažúce katióny tiež zvyčajen schopné viazať dvojväzbové stroncium alebo bárium [B. Furie and B.C. Furie, Cell 53, 508-518 (1988)].

Mnoho týchto proteínov závislých od vitamínu K je zložkou krvenj plazmy a hrajú dôležitú úlohu v homeostáze. Skupiny kyseliny τ -karboxyglutámovej v týchto proteínoch závislých od vitamínu K sú náchadzané v štruktúrne homológnej N-koncovej oblasti Gla [A. Tulinsky, Thromb. Haemost. 66, 16-31 (1991)]. Medzi tieto proteíny viažúce vápenaté ióny s homológnou Gla oblasťou patria okrem iného aj proteín S (PS), proteín C, Faktor IX (FaIX), Faktor II, Faktor VII, Faktor X a Proteín Z.

Aký je význam väzby vápenatých iónov týchto proteínov nakoniec ukazuje zmena vlastností v porovnaní s proteínmi vápnik neviažúcimi. Tento rozdiel je využitý v EP 363 126 pre purifikáciu proteínov. EP 363 126 popisuje metódou izolácie proteínov závislých od vitamínu K, ktoré boli obdržané rekombinantne. Dvojväzbové katióny sú úplne odstranené pridaním chelačných zložiek do kultivačného média pred aktuálnou izoláciou proteínu, a tým je proteín schopný utvoriť väzbu s iónomeničovou živicom, ako je Mono Q. Ďalej je proteín eluovaný z aniónového meniča pridaním NaCl a Ca^{2+} iónov. Nečistoty (42 %) tvoria také proteíny, ktoré sú tiež uvoľnené z iónomeniča použitou koncentráciou soli (0,15 M). V ďalšom purifikačnom kroku je obdržaný proteínový komplex adsorbovaný na kolónu, v ktorej je viazaná imobilizovaná EDTA, potom je premytý a eluovaný. Proteíny v eluáte sú viazané priamo na iónovymieňači a eluované soľným gradientom. Po pridaní CaCl_2 do eluátu je komplex proteín-katión adsorbovaný na hydrofóbnu kolónu a žiadaný proteín je eluovaný pufrom z EDTA.

Nevýhodou metódy popísanej v EP 363 126 je, že mení bežnú konformáciu proteínov závislých od vitamínu K monohonásobným odstraňovaním z kolón a pridaním vápenatých iónov, ktoré

spôsobujú zmeny vlastností proteínu [Johanson et al, J. Biol. 355-363 (1976)]; J. Stenflo, J. Biol. Chem. 251, metódou podľa vynálezu, ktorá nemá tieto nevýhody, keďže neobsahuje krok na odsránenie dvojväzbových kovových iónov, napríklad pomocou chelatónov, počas celého purifikačného procesu.

Výhodou predkladaného vynálezu je, že pôvodná konformácia a stabilita proteínu závislého od vitamínu K sú zachované počas purifikácie.

EP 354 354 popisuje spôsob obohatenia krv zrážajúcich faktorov II, VII, IX a X. Vyššie uvedené protrombín-komplexné faktory sú izolované adsorpciou na matrix nesúci skupinu -hydroxylamín, čím je najmä Faktor IX silne viazaný. Najprv sú pomocou iónovej sily eluované Faktor II, VII a X. Pridanie vápenatých iónov v tejto metóde nehrá úlohu.

EP 317 376 popisuje spôsob separácie Faktora IX, obsiahnutého vo frakcii ľudskej plazmy. Kryoprecipitát je najprv chromatograficky predčistený, potom nasleduje separácia aniónovou výmennou chromatografiou a selektívne eluovanie pufrom so vzrastajúcou iónovou silou a nakoniec je vykonaná afinintá chromatografia na Heparín-Sepharose so selektívnou elúciou. Táto metóda tiež neberie do úvahy zmenu proteínových vlastností Faktora IX v prítomnosti alebo absencii vápenatých iónov.

Podstata vynálezu

Cieľom predkladaného vynálezu je využiteľný spôsob separácie proteínov závislých od vitamínu K a viažúcich vápenaté ióny od sprievodných, od vitamínu K nezávislých, proteínov z roztoku bez požiadavky nevyhnutne odstrániť vápenaté ióny a možnú denaturáciu proteínov s nimi spojenú. Táto metóda, ktorá sa môže uskutočňovať s obohatenými proteínovými roztokmi z prirodzených zdrojov a rovnako dobre so supernatantmi bunkových kultúr rekombinantného proteínu, je jednoduchá a vedie k rýchlo čistým proteínom závislým od vitamínu K.

Riešenie vyššie uvedeného cieľa je dosiahnuté podľa vynálezu pomocou metód popísaných v nárokoch 1-16. Vynález tiež zahrnuje rýchlo čisté proteíny závislé od vitamínu K izolované pomocou týchto metód.

Napríklad supernatanty bunkových kultúr aj médium bunkovej kultúry získané rôznymi cestami, supernatanty z tkanivových kultúr alebo proteínové roztoky z prirodzených zdrojov, ktoré obsahujú proteíny závislé od vitamínu K sú najprv chromatografované cez aniónový vymieňač metódou podľa vynálezu. Špecifické odstránenie dvojväzbových katiónov z proteínového roztoku pred chromatografiou nie je nutné optori metóde popísanej v EP363 126. Ďalej bolo prekvapivo zistené, že pridanie malého množstva vápenatých iónov v nízkej koncentracii soli neviaže na aniónovom vymieňači proteíny závislé od vitamínu K, napriek tomu, že viaže proteíny od vitamínu K nezávislé. V metóde podľa vynálezu bol na separáciu proteínov závislých aj nezávislých od vitamínu K použitý nový typ aniónového vymieňača s hyperdifúznymi vlastnosťami, napríklad Q-Hyper D^R, Sepracor. Nasledovala aniónová výmenná chromatografia a potom afinitná chromatografia doiaľ to vyžaduje ďalšia proteínová purifikácia.

Podľa vynálezu je roztok proteínu závislého od vitamínu K obohacovaný prídavnými proteínmi koncentrujúcim krokom bez predchádzajúceho odstránenia katiónov z proteínového roztoku. Potom je roztok filtrovaný na aniónovom vymieňači a je voliteľne chromatografovaný cez afinitnú kolónu.

Podľa výhodného uskutočnenia je proteínový koncentrát obohatený v prepurifikačnom kroku (prvý krok) filtrovaný na aniónovom vymieňači (druhý krok) a potom je ihneď nanosený na afinitnú kolónu. Výhodná kombinácia sa vyznačuje týmito bodmi:

na aniónovom vymieňači s hyperdifúznymi vlastnosťami (Q-Hyper D^R, Sepracor). Tým bolo dokázané, že nešpecifické väzby farbiva Fenolovej červenej boli redukované na minimum použitím Q-Hyper D^R ako aniónového vymieňača. Farbivo je tiež eluované z aniónového vymieňača pri koncentrácii soli pod minimálnou koncentraciou. V tomto prípade môžu byť eluované proteíny lepšie detekované počas chromatografie. Okrem toho sa zbyvšie nežiadúcich súperiacich reakcií medzi proteínmi a farbivom na vymieňači iónov.

Nasledujúca chromatografia meniaci anióna (druhý krok) je založená na fakte, že aniónová sila roztoku obsahujúceho proteín závislý od vitamínu K je znižovaná pod hodnotu minimálnej koncentrácie soli dialýzou alebo dilúciou s pufrum bez soli a pridaním malého množstva vápenatých iónov. Potom je proteínový roztok opäť daný na vymieňač iónov alebo je cez neho filtrovaný. Tak bolo prekvapivo zistené, že proteíny závislé od vitamínu K nie sú viazané na aniónový vymieňač a sprievodné proteíny nezávislé od vitamínu K adsorbujú na substrát. To je dôsledok rozdielneho náboja proteínov zapríčinený väzbou vápenatých iónov. Tak obdržíme presne proteín závislý od vitamínu K, očistený od kontaminujúcich proteínov predchádzajúceho korku (bez následnej potreby elúcie soli).

V mnohých prípadoch proteínovej purifikácie je kombinácia prepurifikačného kroku (prvý krok) s purifikáciou na aniónovom vymieňači (druhý krok) dostatočná. Druhý purifikačný krok je väčšinou účelný, keďže menšia časť separovaných proteínov závislých od vitamínu K je znečistená sprievodnými proteínmi.

V druhom kroku purifikácie prebiehajúcom na aniónovom vymieňači nie je viazaný proteín závislý od vitamínu K práve vďaka voľbe a výberu koncentrácie soli nižšej než je minimálna koncentrácia soli a pridaním vápenatých iónov.

Využitím schopnosti viazať vápnik proteínov závislých od vitamínu K s Gla-oblasťou boli tieto separované od sprievodných proteínov tak, že pri určitej iónovej sile sú viazené na aniónový menič len sprievodné proteíny, zatiaľ čo proteíny závislé od vitamínu K prejdú vymieňačom iónov bez naviazania. Preto, s odhliadnutím od proteínov závislých od vitamínu K z prirodzených zdrojov, je metóda podľa vynálezu veľmi vhodná pre purifikáciu rekombinantných proteínov závislých od vitamínu K s Gla-oblasťou, ako sú napríklad Proteín C, Faktor IX, Faktor II, Faktor VII, Proteín S a Proteín Z.

Pre vyššie uvedené kroky 1 a 2 je výhodné použiť rovnaký aniónový vymieňač. Veľmi dobré výsledky získame, ak bude aniónová výmenná chromatografia uskutočnená na kolóne.

V nadväzujúcej metóde (tretí krok), konkrétne pri afinitnej chromatografii, prebieha väzba proteínu závislého od vitamínu K na afinitný matrix. V tomto kroku sa tieto proteíny adsorbujú na afinitný matrix. V tomto prípade sa spojenie prepurifikačného korku do série s aniónovým vymieňačom ukázalo ako veľmi vhodné, pretože je tak odstránené množstvo znečisťujúcich proteínov. To podporuje elúciu proteínu závislého od vitamínu K z afinitného matrixu a umožňuje izoláciu požadovaného proteínu s vysokou čistotou.

Metóda podľa vynálezu môže začleniť krok inaktivácie vírusov, ktorý je náročný na osobnú zručnosť, podľa predchádzajúcich prác, ktoré obsahovali opracovanie v roztoku proteínu závislého od vitamínu K fyzikálne-chemickými alebo chemickými metódami. Za týchto okolností je opracovanie v prítomnosti antivírusovej substancie kombinované po uvážení s radiáciou alebo s teplotným krokom. Podľa predloženého vynálezu prebieha inaktivácia vírusov pred separáciou proteínov závislých od vitamínu K od sprievodných od vitamínu K nezávislých proteínov.

Metóda podľa vynálezu sa skladá z kombinácii purifikačných krokov 1, 2 a 3, ktoré môžu byť uskutočňované v rôznom poradí. Napriek tomu krok metódy podľa nároku 1 je vždy nevyhnutne nutný.

Nasledujúce obrázky 1 -12 ukazujú purifikačné kroky alebo výsledky:

Obr.1 Purifikácia rekombinantného Proteínu S zo supernatantu bunkovej kultúry chromatografiou na Q-Hyper (pred-krok = prvý krok);

Obr. 2 Purifikácia rekombinantného Proteínu S chromatografiou na Q-Hyper D s pridaním vápenatých iónov (= druhý krok);

Obr. 3 SDS-PAGE gélovou elektroforézou purifikovaný rekombinantný Proteín S (A: supernatant bunkovej kultúry; B: purifikovaný rPS);

Obr. 4 Purifikácia rFaIX chromatografiou na Q-Hyper D (prvý krok);

Obr. 5 Purifikácia rFaIX chromatografiou na Q-Hyper D s pridaním vápenatých iónov (druhý krok);

Obr. 6 SDS-PAGE gélová elektroforéza rFaIX (A: supernatant bunkovej kultúry; B: purifikovaný rFaIX);

Obr. 7 Purifikácia rFaIX chromatografiou na Heparín-Sefaróze (tretí krok);

Obr. 8 Purifikácia rFaIX párovou chromatografiou na Q-Hyper D a Heparín-Sefaróze (druhý krok a tretí krok);

Obr. 9 SDS-PAGE gélová elektroforéza rFaIX, ako bol získaný v obr. 8;

Obr. 10 Purifikácia rFaII zo supernatantu bunkovej kultúry chromatografiou na Fraktogel^R EMD TMAE 650 (prvý krok);

Obr. 11 Purifikácia rFaII chromatografiou na fraktogel^R EMD TMAE 650 (druhý krok);

Obr. 12 Analýza rFaII SDS-PAGE gélovou elektroforézou (A: supernatant bunkovej kultúry, B: purifikovaný rFaII).

Nasledujúce príklady ukazujú purifikáciu podľa vynálezu Proteínu S, Faktora IX a Faktora II.

Príklady realizácie vynálezu

Príklad 1

a) Purifikácia rPS aniónovou výmennou chromatografiou.

V nasledujúcom príklade bol použitý kvartérny aminotyp aniónového vymieňača s hyperdifúznymi vlastnosťami (Q-Hyper D, Sepracor).

Materiál:

Kolóna: Q-Hyper D, Sepracor; 2 cm x 4 cm.

Pufor A: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0;

Pufor B: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0, 0,18 M NaCl;

Pufor C: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0, 0,4 M NaCl;

Pufor D: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0, 1 mM NaCl.

Rekombinantný proteín (rPS) bol izolovaný bežnými laboratórnymi metódami po infekcii Vero buniek (bunky obličiek opíc) vírusom Vaccinia pomocou technológie bunkovej kultúry. Expresný systém Vero/Vaccinia a podmienky bunkovej kultivácie sú presne popísané v diele F.G: Falkner et al. Thrombosis and Haemostasis, 68, 119-124 (1992) a N. Barrett et al, AIDS Res., 5, 1598-171 (1989); F. Dorner et al, AIDS Research and Clinical Trials, Marcel Dekker, Inc., New York (1990).

Expresia rPS prebieha v komerčne dostupnom, syntetickom DMEM médiu. Po bunkovej kultivácii bol supernatant kultúry izolovaný centrifugáciou a stabilizovaný syntetickým proteázovým inhibítorom Pefabloc^R SC, Pentapharm, do koncentrácie 0,1 mMol/l.

Kolóna bola regenerovaná podľa návodu výrobcu a ekvilibrovaná pufrom A. Potom bolo nanesených 485 ml supernatantu bunkovej kultúry obsahujúcej rekombinantný proteín S na kolónu s prietokom s hodnotou 10 ml/min. Materiál nenaviazaný na kolónu bol odstránený pufrom A s rovnakou rýchlosťou premývania. Potom bola kolóna najprv eluovaná pufrom B a potom pufrom C. Potom bola uskutočnená elúcia pufrom D. Adsorpcia proteínov bola sledovaná počas chromatografie normálnym spôsobom pri 280 nm. Po uskutočnení chromatografie bola stanovená koncentrácia proteínov podľa metódy Brodforda (M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)). Obsah proteínu S bol určený komerčným ELISA systémom (Asserachrome Protein S, Boehringer Mannheim) podľa precipitačného testu (Protin S clotting test, boehringer Mannheim).

Bolo zistené, že takmer všetok rPS bol naviazaný na matrix. rPS bol eluovaný z aniónového meniča, 0,4 M NaCl (pufor C).

Použitím vyššie uvedeného aniónového vymieňača bola Bromfenolová červená, bežne obsiahnutá v médiu bunkovej kultúry, tiež eluovaná z kolóny pri koncentracii soli s hodnotou 0,18 M, ktorá podstatne podporuje následnú izláciu rPS pri 0,4 M NaCl. Toto usporiadanie je výhodné v porovnaní s použitím iných aniónových vymieňačov.

Hlavné a podstatné výsledky purifikácie rPS na aniónovom vymieňači (prvý krok) sú sumarizované v obr. 1 a tabuľke 1. Purifikáciou popísanou v príklade 1 bolo množstvo 3% rPS antigénu k celkovému množstvu proteínmédia bunkovej kultúry

zvýšené na 8 % rPS antigénu k proteínom vo frakcii 0,4 M NaCl. Špecifická aktivita vzrástla 25x.

Tabuľka 1

Vzorka	Obejm	Proteín	Antigénna aktivita proteínu S	Špecifická aktivita	
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	(mU/ml)	
				(U/mg)	
Bunkový supernatant	485	0,108	137	11	0,1
Neviazaná frakcia	560	0,05	4	0	0
0,18 M NaCl	60	0,014	4	0	0
0,4 M NaCl	14	0,537	1700	1358	2,5
1 M NaCl	20	0,54	4	0	0

b) Purifikácia rPS adsorpciou sprievodných proteínov pomocou aniónovej výmennej chromatografie pridaním vápenatých iónov (druhý krok).

Bol použitý rovnaký typ aniónového vymieňača, aký bol popísaný v i a).

Materiály:

Kolóna: Q-Hyper D, Sepracor; 1 cm x 4 cm.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC-500.

Pufor A: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0.

Pufor B: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl₂.

Pufor C: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0, 1 M NaCl.

Kolóna bola regenerovaná podľa inštrukcií výrobcu a ekvilibrovaná pufrom B. Rekombinantný proteín S, ktorý bol izolovaný zo supernatantu bunkovej kultúry ako v príklade 1, bol nariadený dvakrát pufrom A tak, aby koncentrácia NaCl ležala pod hodnotou 0,18 M. Bol pridaný CaCl_2 s koncentráciou 10 mM. Po premiešaní bol proteín nanosený na kolónu a nenaviazaný proteín bol odmytý z kolóny pufrom B. Viazaný proteín bol eluovaný pufrom C. Priebeh chromatografie a zisťovanie koncentrácie proteínov bol rovnaký ako v príklade 1.

výsledky ukazujú, že rPS prešiel kolónou bez zábran, zatiaľ čo väčšina ďalších proteínov zostala v kolóne. Tieto znečisťujúce proteíny boli eluované 1 M NaCl. Zásadné výsledky tohto pokusu sú sumarizované v obr. 2, obr. 3 a tabuľke 2.

Purifikáciou popísanou vyššie príkladom 1 b) bol antigénny obsah rPS zvýšený 12x v pomere k ostatným proteínom. Špecifická aktivita sa zvýšila 14x. Denaturačná elektroforetická analýza [U.K.Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)] ukazuje (obr. 3), že purifikáciou podľa príkladu 1 b) bol izolovaný rPS vo viac než 95% čistote.

Tabuľka 2

Vzorka	Objem	Proteín	Antigénna aktivita proteínu S	Špecifická aktivita	
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	(U/mg)	
prevzatá z pr.1	34	0,215	680	543	2,5
Nenaviazaná frakcia	34	0,014	600	520	37
1,0 M NaCl	10	0,332	83	0	0

Príklad 2

a) Purifikácia rFaIX aniónovou výmennou chromatografiou

V nasledujúcom príklade bol použitý kvartérny amino-
-typ aniónového vymieňača s hyperdifúznymi vlastnosťami (Q-
-Hyper D, sepracor).

Materiály:

Kolóna: Q-Hyper D, Sepracor: 2 cm x 4 cm.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC-500.

Pufor A: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 5,5.

Pufor B: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 5,5, 0,18 M NaCl.

Pufor C: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 5,5, 0,3 M NaCl.

Pufor D: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 5,5, 1,0 M NaCl.

Rekombinantný Faktor IX (rFaIX) bol získaný podobným
prístupom ako rPS (Príklad 1 a)).

Kolóna bola regenerovaná podľa inštrukcií výrobcu
a ekvilibrovaná pufrom A. Následne bolo 1997 ml supernatantu
bunkovej kultúry obsahujúceho rekombinantný Faktor IX nanosených
rýchlosťou 10 ml/min na kolónu. Nenaviazaný materiál bol
odstraný z kolóny rovnako rýchlym premývaním pufrom A.
potom bola kolóna premytá najprv pufrom B, potom pufrom C
a nakoniec pufrom D.

Adsorpcia proteínu bola sledovaná počas chromatografie
normálnym spôsobom pri 280 nm. Po skončení chromatografie
bol koncentrácia proteínu zisťovaná podľa Bradforda (M. Bradford,
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)). Obsah faktora IX bol určovaný
podľa komerčného precipitačného testu (Factor IX clotting,
Immuno).

Výsledky ukazujú, že takmer všetok rFaIX bol viazaný
na aniónový vymieňač. rFaX bol eluovaný z aniónového vymieňača
0,3 M NaCl. Obdobné výsledky boli tiež obdržané pri použití

iných kvartérnych amino-aniónových vymieňačov. Ďalej použitím Q-Hyper D bola brómfenolová červená, bežne obsiahnutá v médiu bunkovej kultúry, tiež eluovaná z kolóny pri koncentrácii soli pod hodnotu 0,3 M, ktorá podstatne podporuje nasledujúcu izoláciu rFaIX pri koncentrácii NaCl s hodnotou 0,3 M. Iné aniónové vymieňače tieto výhodné vlastnosti nemajú.

Zásadné výsledky purifikácie rFaIX na aniónovom vymieňači sú sumarizované v Obr. 4 a Tabuľke 3. Purifikáciou popísanou v príklade 2 a) bol rFaIX obohatený 20x, špecifická aktivita bola zvýšená 12x.

Tabuľka 3

Vzorka	Objem	Proteín	Aktivita faktora IX	Špecifická aktivita
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	(U/ml)
Bunkový supernatant	1997	0,178	100	0,56
Nenaviazaná frakcia	2100	0,091	0	0
0,18 M NaCl	94	0,382	162	0,41
0,3 M NaCl	94	0,300	2099	6,86
1 M NaCl	93	0,09	32	0,35

b) Purifikácia rFaIX adsorpciou sprievodných proteínov pomocou aniónovej výmennej chromatografie s pridaním vápenatých iónov.

Typ použitého aniónového vymieňača bol Q-Hyper ; ktorý bol použitý tiež v príklade 2 a).

Materiály:

Kolóna: Q-Hyper D, Sepracor; 2 cm x 4 cm.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC-500.

pufor A: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,4.

Pufor B: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl₂.

Pufor C: 20 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,4, 1,0 M NaCl.

Kolóna bola regenerovaná podľa inštrukcií výrobcu a ekvilibrovaná pufrom A. 85 ml rekombinantného faktora IX, ako bol získaný v príklade 2 a) bolo nariedených 2x pufrom A tak, že koncentrácia NaCl bola znížená na 0,15 M. CaCl₂ bol pridaný do koncentrácie 10 mM. Potom bola proteínová zmes nanášaná a nenaviazaný proteín bol vymytý z kolóny pufrom B. Proteíny naviazané na kolónu boli eluované pufrom C. Priebeh chromatografie bol v súlade s popisom príkladu 2 a). Boli stanovené koncentrácie proteínov a enzýmová aktivita.

výsledky ukazujú, že rFaIX prešiel kolónou bez zábran, no prevážna väčšina znečisťujúcich proteínov zostala na kolóne. Tieto znečisťujúce proteíny boli eluované 1 M NaCl.

Zásadné výsledky sú zhrnuté v Obr. 5, Obr. 6 a Tabuľke 4. Purifikáciou popísanou v príklade 2 b) bola zvýšená špecifická aktivita rFaIX 4x. Danaturačná elektroforetická analýza podľa Leammliho ukázala (obr. 6), že purifikáciou popísanou v príklade 2 b) bol izolovaný rFaIX v čistote väčšej než 80%.

Tabuľka 4

Vzorka	Objem	Proteín	Aktivita	Špecifická faktora IX	Špecifická aktivita
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)		(U/ml)
prevzatá z pr. 2a	170	0,153	1040		6,7
Nenaviaz. frakcia	200	0,04	1076		27,5
1 M NaCl	20	0,45	0		0

c) Purifikácia rFaIX afinitnou chromatografiou

v nasledujúcom príklade bol rFaIX získaný rovnakou cestou ako v príklade 2 a) purifikovaný afinitnou chromatografiou. Ako afinitný matrix bola použitá Heparin-Sepharosa.

Materiál:

Kolóna: HiTrap_R Heparin, Pharmacia; 5 ml.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC-500.

Pufor A: 50 mM Tris, 20 mM sodium citrát , pH 7,4.

Pufor B: 50 mM Tris, 20 mM sodium citrát, pH 7,4, 0,15 M NaCl.

Pufor C: 50 mM Tris, 20 mM sodium citrát, pH 7,4, 0,3 M NaCl.

Pufor D: 80 mM Tris, 20 mM sodium Citrát, pH 7,4, 1 M NaCl.

Kolóna bola regenerovaná podľa inštrukcií výrobcu a ekvilibrovaná pufrom A. 78 ml rFaIX získaného v príklade 2 a) bolo nanosených na kolónu a nenaviazaný proteín bol vymytý z kolóny pufrom A. Ďalej bola kolóna eluovaná pufrom B, potom pufrom C a nakoniec pufrom D. Priebeh chromatografie sa držal rovnakého popisu ako v príklade 2 a); boli stanovené koncentrácie proteínov a enzýmová aktivita.

výsledky ukazujú, že rFaIX bol úplne naviazaný na kolónu, a najprv z nej eluovaný 0,3 M NaCl. Jednako len boli v tejto metóde súčasne eluované rFaIX ďalšie proteíny, takže nedôjde k oddeleniu od rFaIX. Špecifická aktivita rFaIX bola metódou v príklade 2 c) zvýšená len 4,5x.

Zásadné výsledky sú zhrnuté v Obr. 7 a Tabuľke 5.

Tabuľka 5

Vzorka	Objem	Proteín	Aktivita	Špecifická
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	faktora IX aktivita (U/mg)
prevzatá z pr. 2a	78	0,121	788	6,5
Nenaviazaná frak.	90	0,038	0	0
0,15 M NaCl	10	0,10	0	0
0,3 M NaCl	22	0,053	1572	29,6

Príklad 3

Purifikácia rFaIX priamym párovaním aniónovej výmennej chromatografie a afinitnej chromatografie.

V nasledujúcom príklade bol rFaIX, získaný v príklade 2 a) purifikovaný takým spôsobom, že bol najprv aplikovaný na aniónový vymieňač a potom na afinitnú chromatografickú kolónu. Q-Hyper D slúžil ako aniónový vymieňač: t.j. aniónový vymieňač s hyperdifúznymi vlastnosťami. Ako afinitný matrix bola použitá Heparin-Sepharosa (HiTrap^R Heparin, Pharmacia). Q-Hyper D kolóna bola pripojená v priamej sérii pred Heparin-Sepharosovú kolónu. Medzi kolóny bola namontovaná len ohybná spojovacia rúrka (zmenšená na minimum), pokiaľ možno s ventilom.

Materiál:

Kolóna 1: Q-Hyper D^R, Sepracor; 2 c, x 4 cm.

Kolóna 2: HiTrap^R Heparin, Pharmacia; 5 ml.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC—500.

Pufor A: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4.

Pufor B: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂.

Pufor C: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1,0 M NaCl.

Pufor D: 50 mM Tris, 20 mM sodium citrát, pH 7,4, 0,15 M NaCl.

Pufor E: 50 mM tris, 20 mM sodium citrát, pH 7,4, 0,3 M NaCl.

pufor R: 50 mM Tris, 20 mM sodium citrát, pH 7,4, 1M NaCl.

odtok kolóny s aniónovým vymieňačom bol priamo spojený s vtokom afinitnej chromatografickej kolóny ohybnou spojovacíou rúrkou tak, že prúd kvapaliny najprv prechádza kolónou 1 a potom priamo kolónou 2.

Kolóny boli regenerované podľa inštrukcií výrobcu a ekvilibrované pufrom B. 70 ml rFaIX, ktorý bol izolovaný zo supernatantu bunkovej kultúry, ako je popísané v príklade 2 a) bolo nariadených 2x pufrom A tak, že koncentrácia NaCl bola znížená na 0,15 M. CaCl₂ bol pridaný do koncovej koncentrácie 10 mM. Potom bola proteínová zmes prevedená cez kolónu 1 (Q-Hyper D) rýchlosťou 2,5 ml/min a priamo prevedená na kolónu 2 (Heparin-Sepharosa). Nenaviazaný proteín bol vymytý z kolón pufrom B. Potom bola kolóna 1 oddelená od afinitnej kolóny a prúd kvapaliny bol priamo nanášaný na kolónu 2. Analogicky ako v metóde popísanej v príklade 2 c) bol naviazaný proteín odstraný z heparínovej kolóny premytím pufrom D. Nasledovala elúcia heparínovej kolóny pufrom E.- Nakoniec bola uskutočnená elúcia pufrom F. Podobné výsledky boli získané, ak po nanesení vzorky Q-Hyper D kolóna nebola odstranená do heparínovej kolóny, ale namiesto toho bol prúd kvapaliny pre elúciu heparínovej kolóny vedený priamo na heparínovú kolónu spojovacím ventilom.

Proteíny viazané na kolóne 1 (Q-Hyper D^R) boli eluované pufrom C.

Priebeh chromatografie bol rovnaký ako v príklade 2 a); boli určené koncentrácie proteínov a enzýmová aktivita.

výsledky ukazujú, že po nanosení vzorky na zaradenú kolónu Q-Hyper D^R rFaIX prejde bez zábran a je kompletne adsorbovaný na heparínovú kolónu umiestenú potom. rFaIX bol eluovaný neskôr 0,3 M NaCl.

Zásadné výsledky sú zhrnuté v Obr. 8 a Obr. 9 a Tabuľke 6.

Purifikáciou popísanou v príklade 3 bol rFaIX obohatený 8,4x; špecifická aktivita bola zvýšená 8,8x. Denaturačná elektroforetická analýza podľa Laemmliho ukazuje (Obr. 9), že rFaIX je metódou popísanou v príklade 3 izolovaný vo viac než 95% čistote.

V príklade 3 bola purifikácia rFaIX uskutočňovaná priamou kombináciou metód z príkladu 2 a), b) a c), ktoré využívali rovnaký začiatočný materiál. Jednako len v porovnaní s purifikáciou v príklade 2 c) bolo dosiahnuté kombináciou aniónovej výmennej chromatografie a afinitnej chromatografie vyššie obohatenie a vyššia špecifická aktivita. Vďaka kombinácii oboch chromatografických metód sú znečisťujúce proteíny, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú separačný proces na afinitnom substráte samozrejme separované dopredu, čím sa dosiahne vyššia špecifita a selektivita afinitného substrátu.

Tabuľka 6

Vzorka	Objem	Proteín	Aktivita faktora IX	Špecifická aktivita
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	(U/mg)
prevzatá z prík.				
2a	148	0,0196	123	6,3
Nenaviazaná frak.	160	0,01	0	0
0,15 M NaCl	32	0,01	0	0
0,3 M NaCl	10	0,019	1041	54,8
1 M NaCl	30	0,015	0	0

Príklad 4

a) Purifikácia rFaIX aniónovou výmennou chromatografiou.

V nasledujúcom príklade bol použitý kvartérny amno-typ aniónového vymieňača s tykadlovou štruktúrou (Fraktogel EMD TMAE 650 M, Nerck).

Materiál:

Kolóna: Fraktogel EMD TMAE 650 M, Merck, 1,6 cm x 5 xm.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC-500 systém.

Pufor A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4.

Pufor B: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl.

Pufor C: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 300 mM NaCl.

Pufor D: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 M NaCl.

Izolácia rekombinantného Faktora II bola založená na bežných laboratórnych metódach technológie bunkových kultúr [Falkner et al. Thrombosis and Haemostasis, 68, 119-124 (1992)].

Expresia rFaII prebiehala v komerčne dostupnom syntetickom médiu DMEM. Bezbuňkový supernatant bunkovej kultúry bol získaný centrifugáciou.

Kolóna bola regenerovaná podľa inštrukcií výrobcu a ekvilibrovaná pufrom A. Potom bolo 200 ml bunkového supernatantu obsahujúceho rekombinantný Faktor II nanesených na kolónu rýchlosťou 4 ml/min. Materiál nenavi a zaný na kolónu bol odmytý pufrom A rovnakou rýchlosťou. Nasledovalo premytie pufrom B a potom pufrom C. Nakoniec bola uskutočnená elúcia pufrom D. Adsorpcia proteínov bola počas chromatografie sledovaná bežným spôsobom pri 280 nm. Po chromatografii boľa určená koncentrácia proteínu podľa Bradfordovej metódy. Osah Faktora II bol stanovený pomocou precipitačného testu (Thrombinzeit, Immuno AG).

Bolo zistené, že takmer všetok rFaII bol naviazaný na aniónový vymieňoáčový gel. rFaII bol z aniónového vymieňača eluovaný 0,3 M NaCl. Ďalej, oproti iným amino-typom aniónového vymieňača, ako sú MacroPrep^R (Bio-Rad) alebo Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), bola brómfenolová červená, bežne obsiahnutá v supernatante bunkovej kultúry, vždy eluovaná z kolóny koncentráciou soli 0,2 M NaCl, ktorá podstatne podporovala následnú izoláciu rFaII 0,3 M NaCl.

Zásadné výsledky purifikácie rFaII na aniónovom vymieňači sú zhrnuté v Obr. 10 a Tabuľke 7. Purifikáciou popísanou v príklade 4 bola špecifická aktivita rFaII zvýšená 3,5x.

Tabuľka 7

Vzorka	objem	Proteín	Aktivita Faktora II	Špecifická aktivita
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	(U/mg)
bunkové médium	200	0,45	50	0,1
Nenaviazaná frak.	200	0,177	2	0,01
0,2 M NaCl	40	0,4	6	0,015
0,3 M NaCl	45	0,36	150	0,42
0,5 M NaCl	32	0,25	0	0

b) Purifikácia rFaII adsorpciou sprievodných proteínov aniónovou výmennou chromatografiou s pridaním vápenatých iónov.

Použitým aniónovým vymieňačom bol Fraktogel EMD TMAE 650 M (Merck).

Materiál:

Kolóna: Fraktogel EMD TMAE 650 M, 1,6 cm x 5 cm.

Prístroj: Pharmacia FPLC LCC-500.

Pufor A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4.

Pufor B: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂.

Pufor C: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1,0 mM NaCl.

Kolóna bola regenerovaná podľa inštrukcií výrobcu a ekvilibrovaná pufrom B. Rekombinantný Faktor II izolovaný zo supernatantu bunkovej kultúry tak, ako bolo popísané v príklade 4 a) bol nariedený 2x pufrom A tak, že konečná koncentrácia NaCl bola menšia než 0,2 M. CaCl₂ bol pridaný do konečnej koncentrácie 10 mM. Potom bola proteínová zmes nanosená na kolónu a nenaviazaný proteín bol z kolóny vymytý pufrom B. Viazaný proteín bol eluovaný pufrom C.

Priebeh chromatografie bol zhodný s predchádzajúcim príkladom a ďalej bola stanovená koncentrácia proteínov. výsledky ukazujú, že rFaII prešiel kolónou bez prekážky, zatiaľ čo prevážna väčšina znečisťujúcich proteínov zostala na kolóne. Tieto proteíny boli eluované 1 M NaCl.

Zásadné výsledky sú zhrnuté v Obr. 11, Obr. 12 a Tabuľke 8. Vďaka purifikácii popísanej v príklade 4 a) a b) vzrástla špecifická aktivita rFaII 11x.

Denaturačná elektroforetická analýza podľa Laemliho ukazuje (Obr. 9), že purifikáciou popísanou v príkladoch 4 a) a b) bol izolovaný rFaII s viac než 95% čistotou.

Tabuľka 8

Vzorka	Objem	Proteín	Aktivita	Špecifická
	(ml)	(mg/ml)	(mU/ml)	Faktora II aktivita (U/mg)
prevzatá z pr. 4a	80	0,18	75	0,41
Nenaviazaná frak.	80	0,015	75	4,6
1,0 M NaCl	15	0,62	0	0

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob separácie proteínu závislého od vitamínu K od sprievodných, od vitamínu K nezávislých proteínov roztoku obsahujúceho proteíny, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sú do tohto roztoku pridané vápenaté ióny a roztok obsahujúci vápnik je nanosený na aniónový vymieňač za podmienok, z ktorých sú adsorbované sprievodné proteíny, ale nie proteíny závislé od vitamínu K.
2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že roztok obsahujúci proteíny závislé od vitamínu K je dodatočne nanosený na aniónový vymieňač za podmienok, v ktorých je proteín závislý od vitamínu K adsorbovaný na vymieňač, premytý, eluovaný a voliteľne je iónová sila eluátu znižovaná.
3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že neadsorbovaný proteín závislý od vitamínu K je adsorbovaný na afinitný substrát a selektívne eluovaný.
4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je vykonávaný metodickými krokmi podľa nároku 2 a/alebo 3 v rôznom poradí alebo kombinácii.
5. Spôsob podľa nároku 1 a 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že separačný krok je uskutočňovaný s rovnakým aniónovým vymieňačom, výhodne s podpornou chromatografiou.
6. Spôsob podľa nárokov 1, 2, 3, 4 a 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aniónový vymieňač má hyperdifúzne vlastnosti.
7. Spôsob podľa nároku 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako substrát aniónového vymieňača je použitý Q-Hyper D^R.

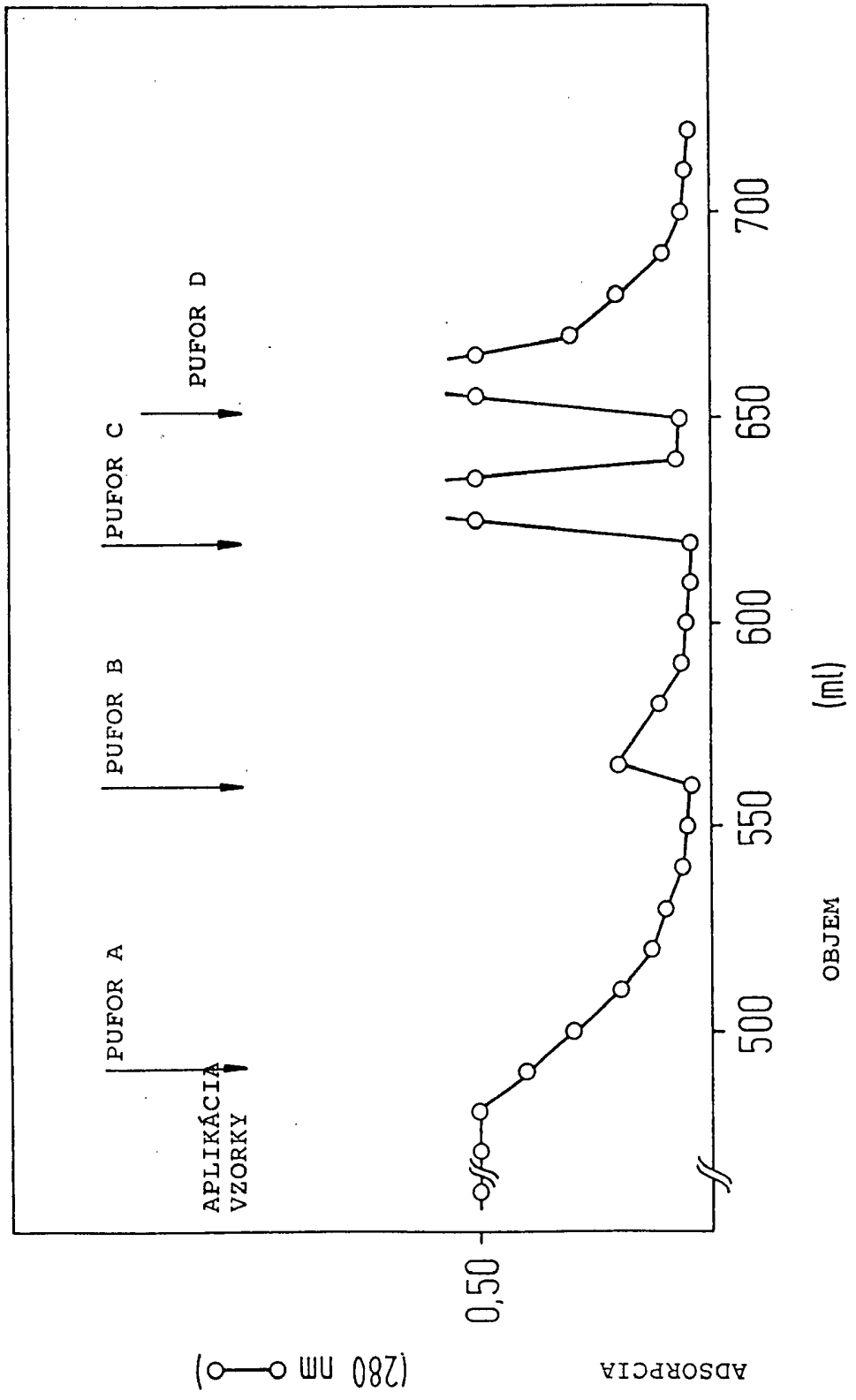
8. Spôsob podľa nárokov 1, 2, 3, 4 a 5, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že aniónový vymieňač má tykadlovú štruktúru.
9. Spôsob podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že afinitný substrát je vyberaný zoskupiny heparín viažúcich substrátových materiálov, Heparin-Sepharosa a heparín-agaróza.
10. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že iónová sila proteínového roztoku po elúcii je znížená na 0,15 až 0,2 M.
11. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je pridaný CaCl_2 do minimálnej koncentrácie 1,0 mM.
12. Spôsob podľa nárokov 1, 2 a 3, v y z n a č u j ú - c i s a t ý m, že proteínový roztok má hodnotu pH v rozmedzí od 4 do 9.
13. Spôsob podľa nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že proteín závislý od vitamínu K je vyberaný z FII, FVII, FIX, FX, Proteínu S, Proteínu C a Proteínu Z.
14. Spôsob podľa nároku 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že proteíny sú produkované pomocou metóda génovej technológie a sú izolované zo supernatantu kultúr transformovaných alebo transektovaných buniek.
15. Spôsob izolácie proteínu závislého od vitamínu K podľa nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 a 14.
16. Spôsob izolácie sprievodného, od vitamínu K nezávislého proteínu podľa nárokov 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 a 14.

17. Vysoko purifikovaný proteín závislý od vitamínu K, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je produkovaný podľa metód podľa nárokov 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 a 14 a predkladaný aspoň v 95% čistote.

26-988 Nd

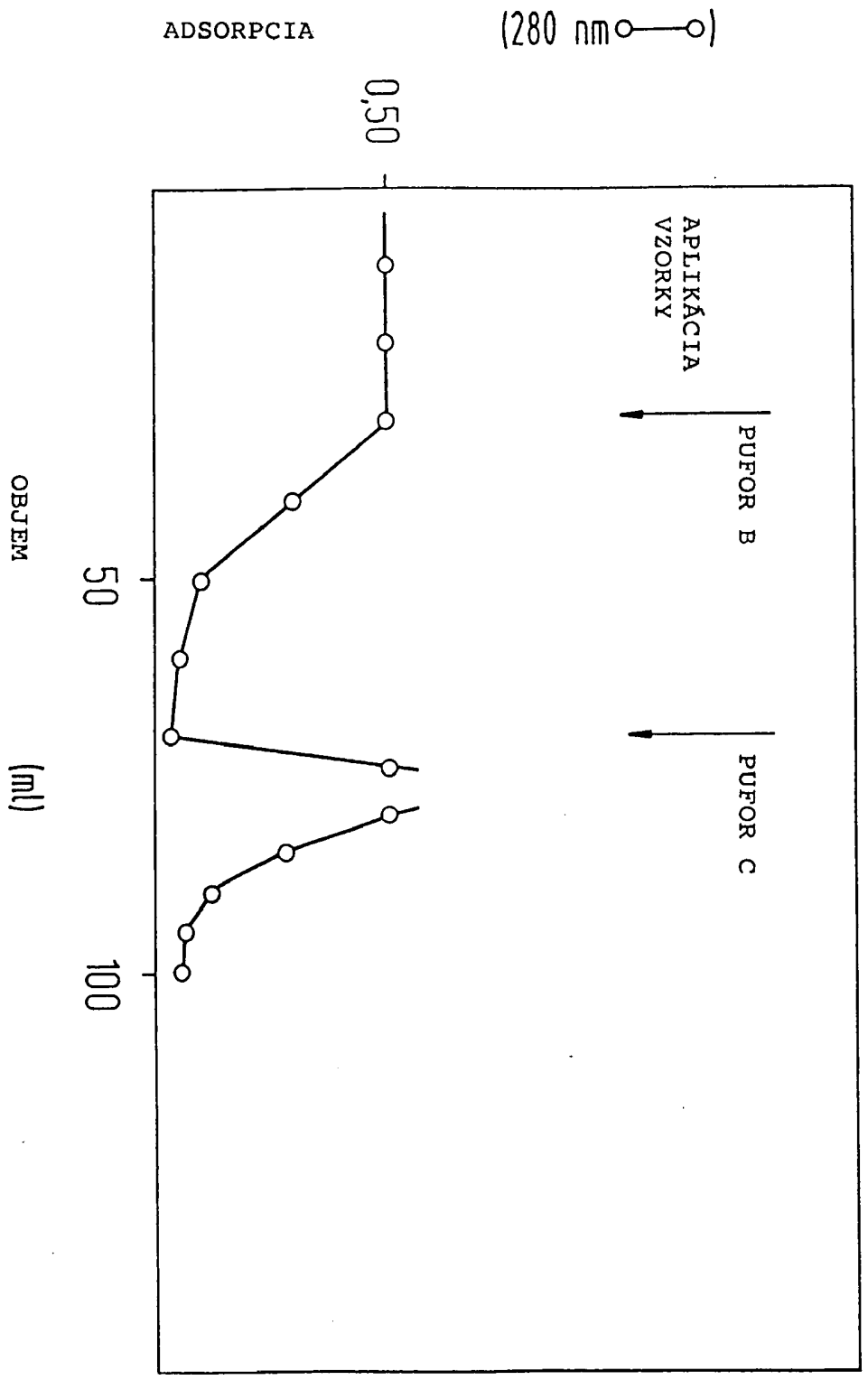
OBR.1

PURIFIKÁCIA rPs Z MÉDIA BUNKOVEJ KULTÚRY CHROMATOGRAFIOU NA Q-HYPER D



OBR.2

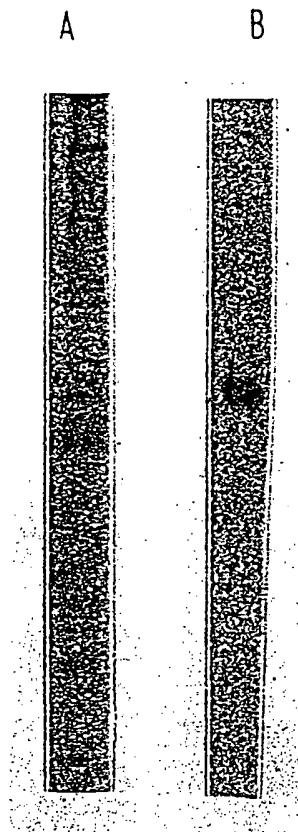
PURIFIKÁCIA FPS CHROMATOGRAFIOU NA Q-HYPER D S PRIDANÍM VÁPENATÝCH IÓNOV



OBR.3

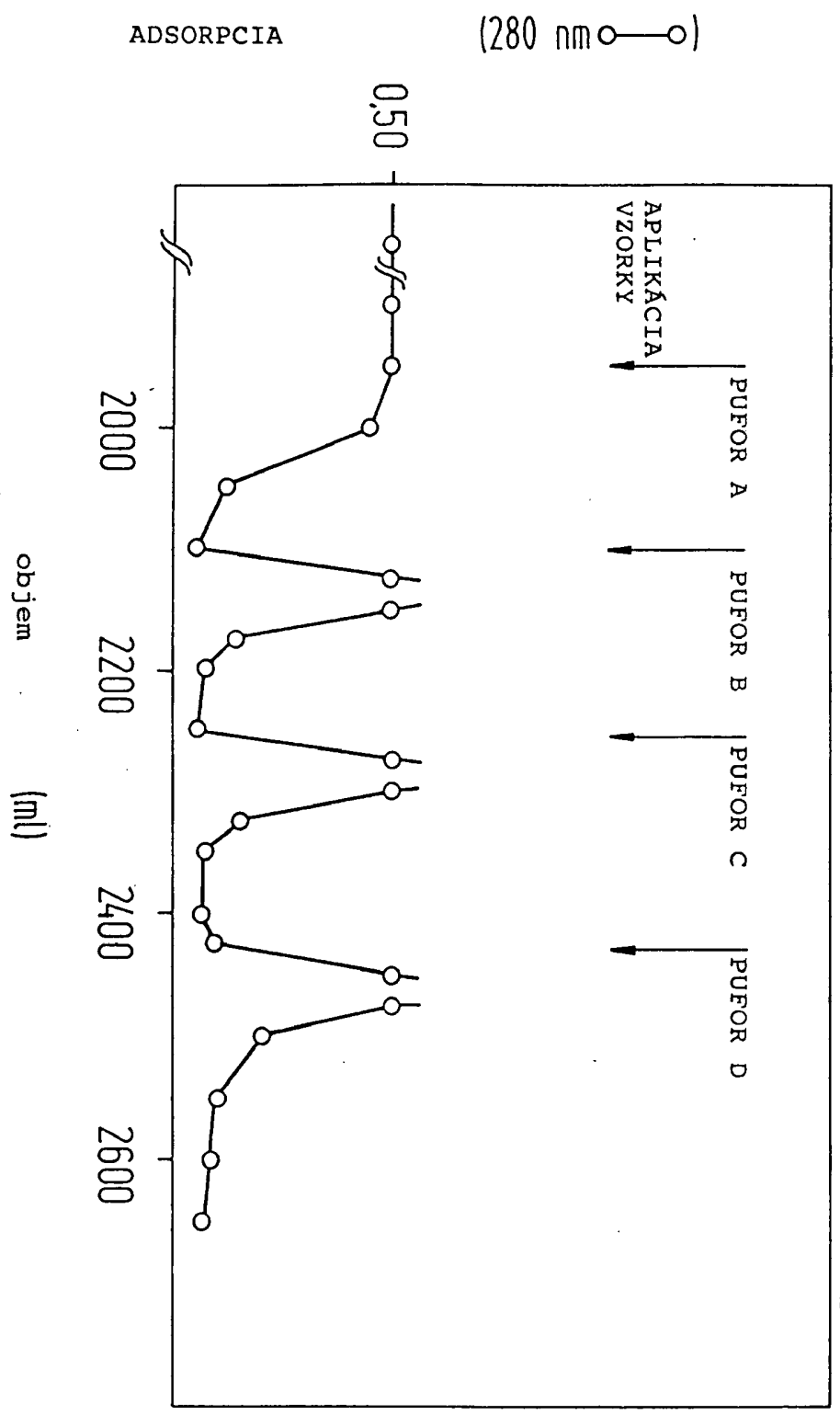
ANALÝZA rPS SDS-POLYAKRYLAMIDOVOU GELOVOU ELEKTROFORÉZOU

(A: SUPERNATANT BUNKOVEJ KULTÚRY; B: PURIFIKOVANÝ rPS).



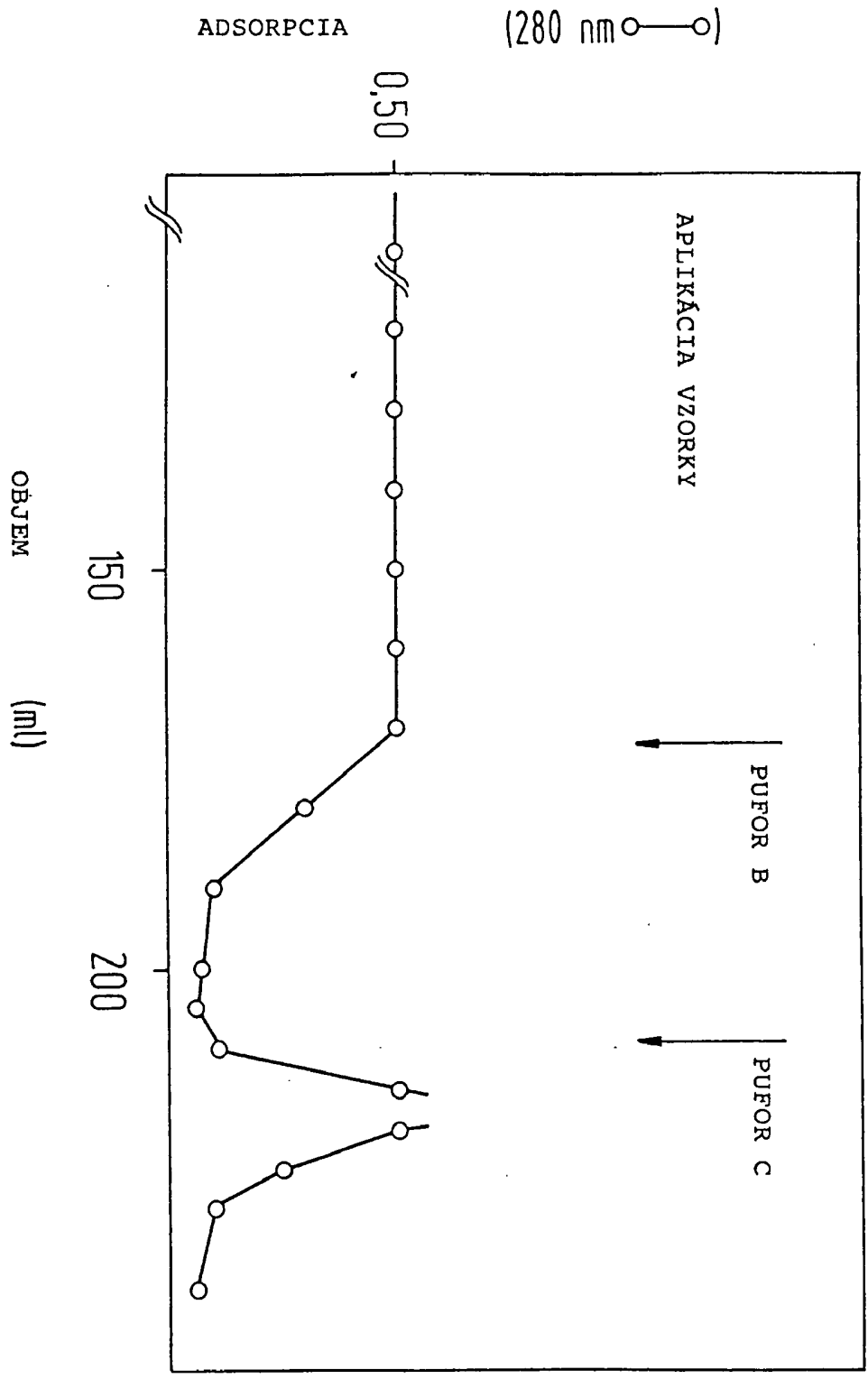
OBR.4

PURIFIKÁCIA rFa IX Z MÉDIA BUNKOVEJ KULTÚRY CHROMATOGRAFIOU NA Q-HYPER D



OBR. 5

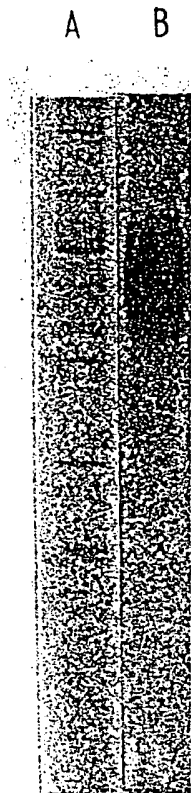
PURIFIKÁCIA rFa IX CHROMATOGRAFIU NA Q-HYPER D
S PRIDANÍM VÁPENATÝCH IÓNOV



OBR. 6

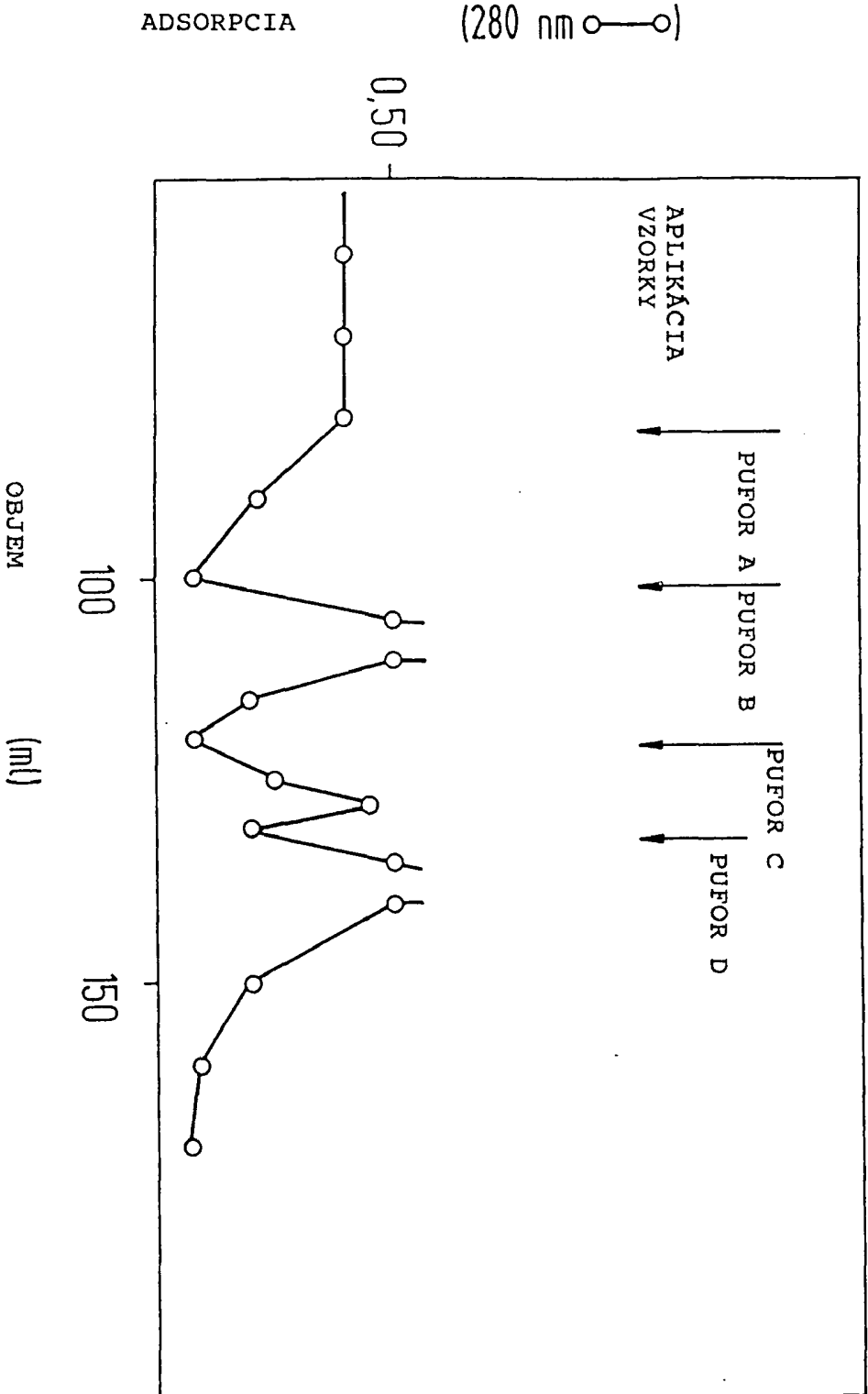
ANALÝZA rFa IX SDS-POLYAKRYLAMIDOVOU GELOVOU ELEKTROFORÉZOU

(A: SUPERNATANT BUNKOVEJ KULTÚRY; B: PURIFIKOVANÝ rFa IX).



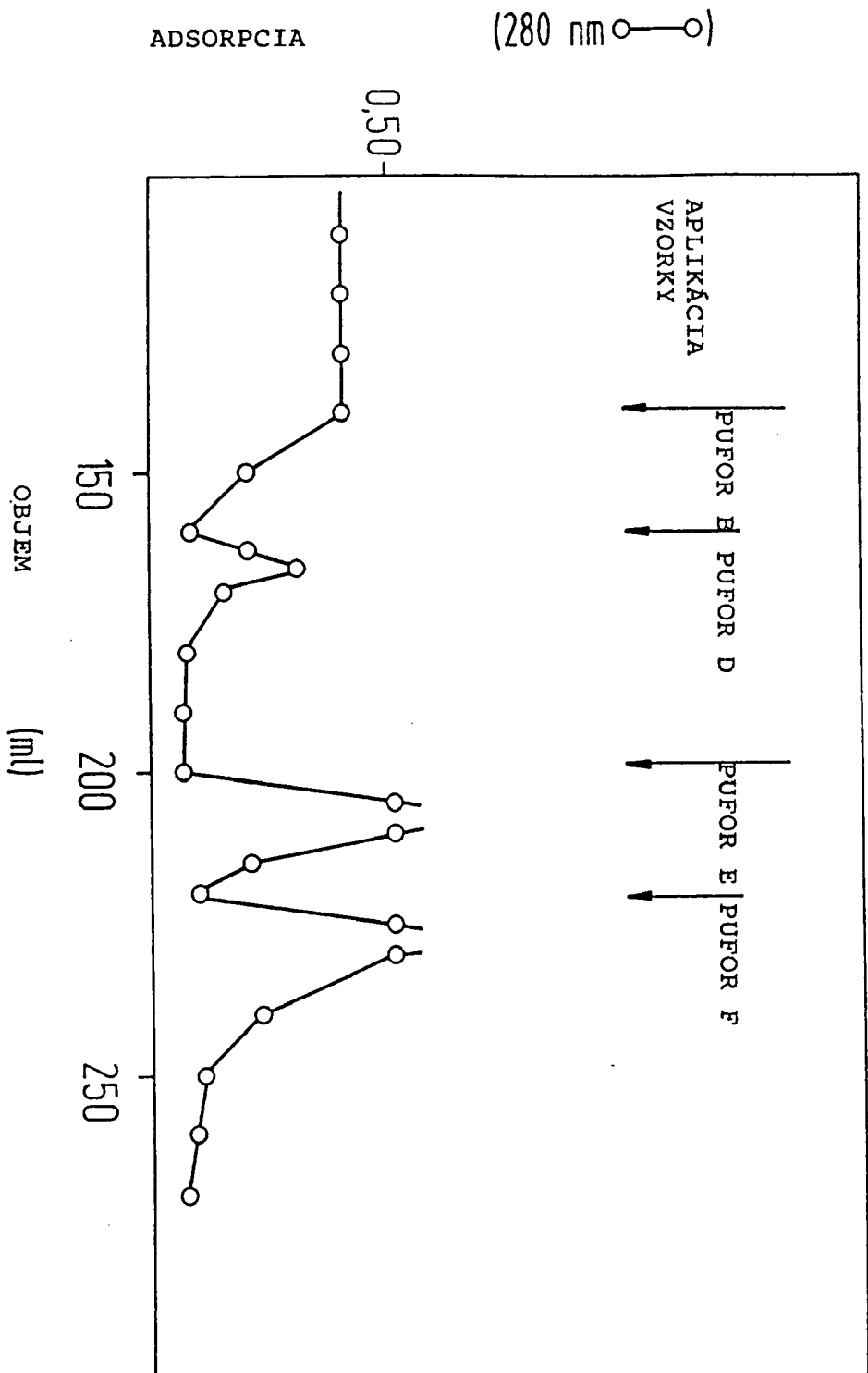
OBR. 7

PURIFIKÁCIA rFa IX CHROMATOGRAFIU NA HEPERIN-SEPHAROSE



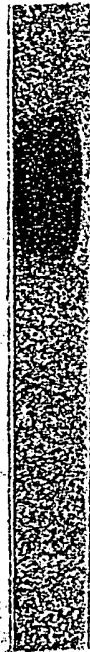
OBR.8

PURIFIKÁCIA rFa IX PÁROVOU CHROMATOGRAFIU NA ϕ -HYPER
D A HEPARÍN SEPHAROSE



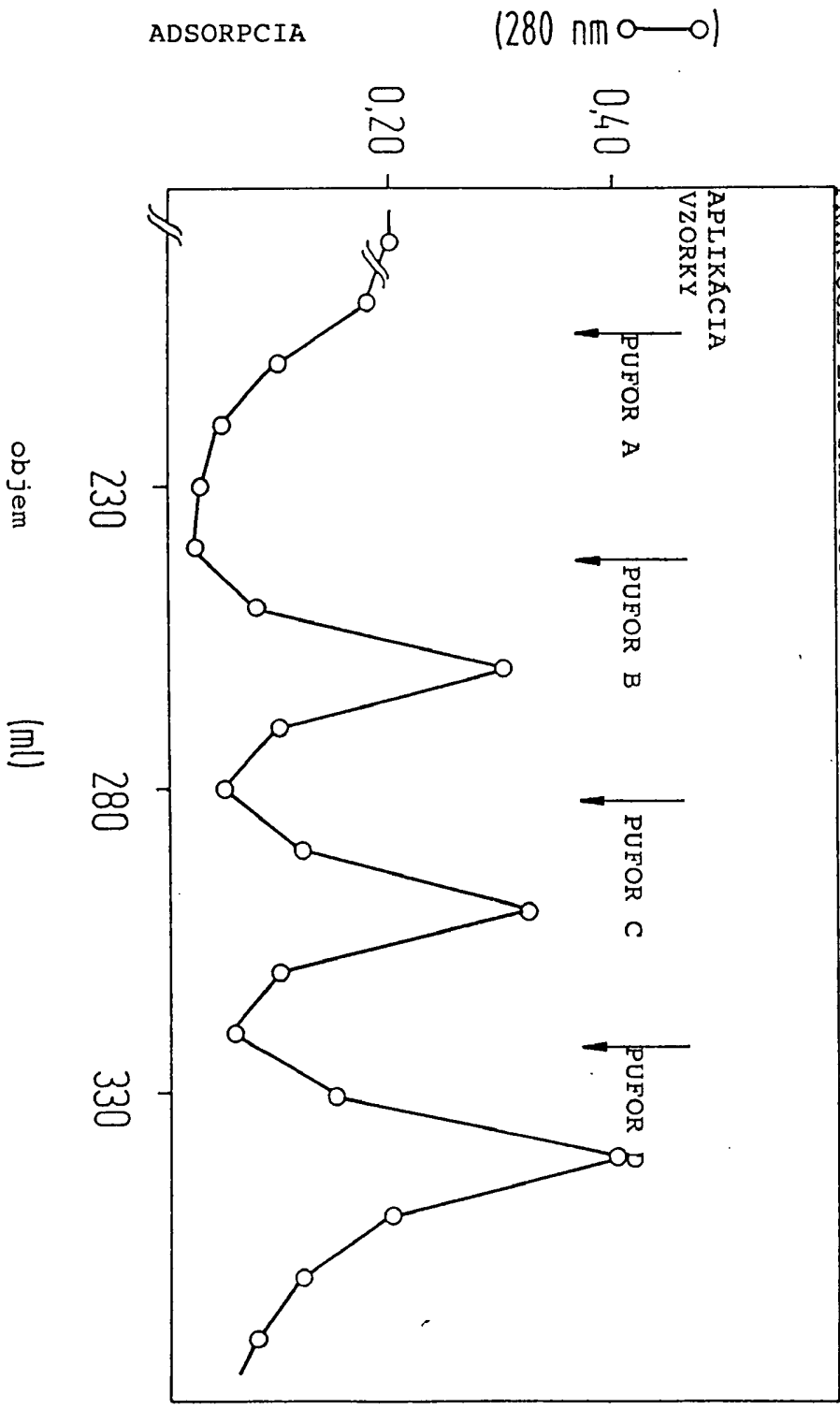
OBR.9

ANALÝZA PURIFIKOVANÉHO rFa IX SDS-POLYAKRYLAMIDOVOU
GELOVOU ELEKTROFORÉZOU



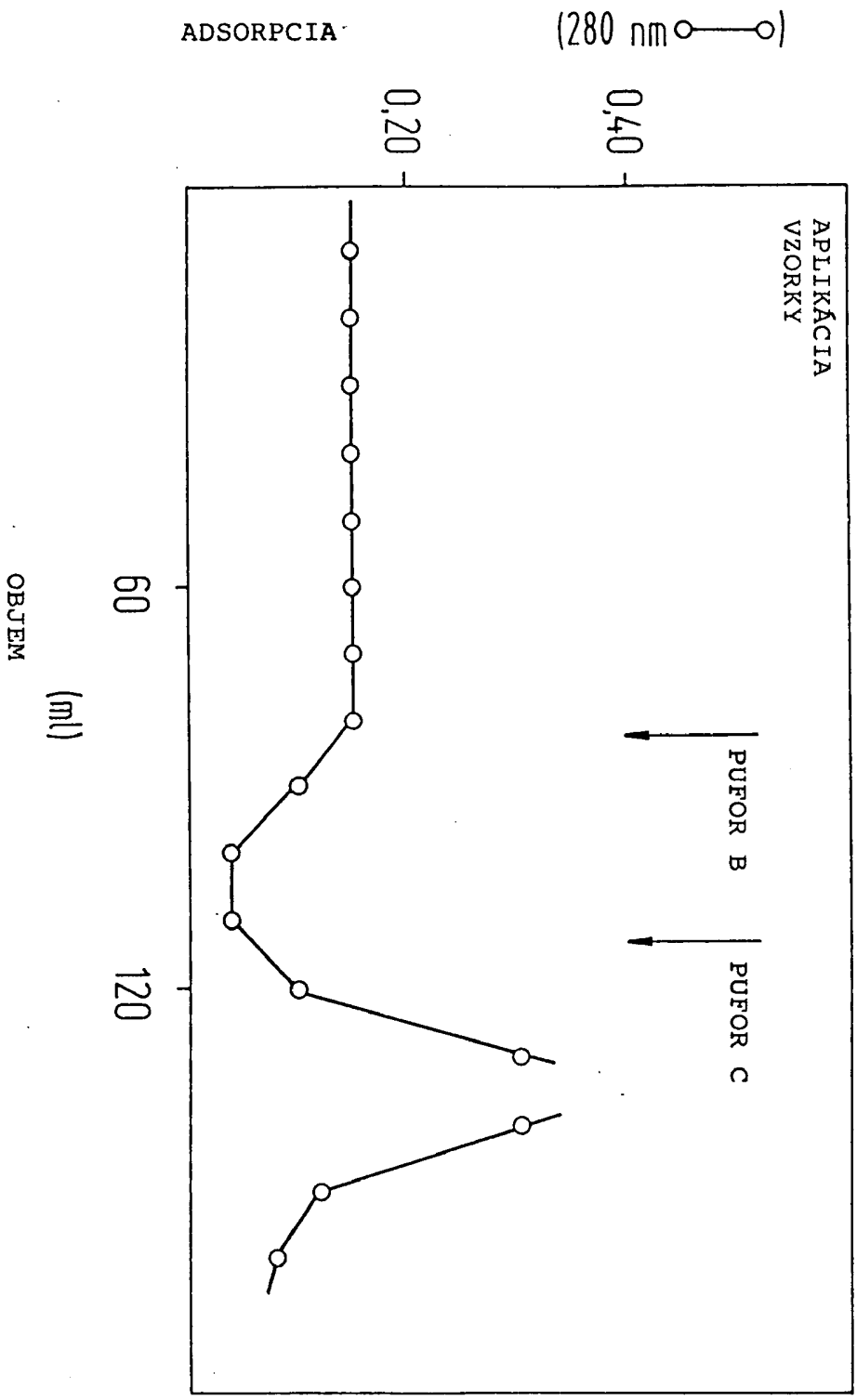
OBR. 10

PURIFIKÁCIA rFa II Z MÉDIA BUNKOVEJ KULTÚRY CHROMATOGRAFIOU NA FRAKTOGEL EMD TMAE 650



OBR.11

PURIFIKÁCIA FFA II CHROMATOGRAFIU NA FRAKTOGEL EMD TMAE 650
S PRIDANÍM KALCIOVÝCH IÓNOV:



OBR.12

ANALÝZA PURIFIKOVANÉHO rFa II SDS-POLYAKRYLAMIDOVOU
GELOVOU ELEKTROFORÉZOU

(A: SUPERNATANT BUNKOVEJ KULTÚRY; B: PURIFIKOVANÝ rFa II).

