



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003109430/13, 18.08.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.08.2001

(30) Конвенционный приоритет:
08.09.2000 (пп.1-12) DE 10044360.5

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2004

(45) Опубликовано: 20.05.2007 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: K.HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL.
High-level expression and purification of the
major birch pollen allergen. Bet v 1. Protein
expression and purification, 1999, 9, 33-39.
WO 9814467, 09.04.1998. EP 0596459 A2,
11.05.1994. RU 2075509 C1, 20.03.1997.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
08.04.2003

(86) Заявка РСТ:
EP 01/09552 (18.08.2001)

(87) Публикация РСТ:
WO 02/20559 (14.03.2002)

Адрес для переписки:
101000, Москва, пер. М.Златоустинский, 10,
кв.15, бюро "ЕВРОМАРКПАТ", И.А.Веселицкой

(72) Автор(ы):

ЗУКК Роланд (DE),
КРОМВЕЛЛЬ Оливер (DE),
ФИБИГ Хельмут (DE)

(73) Патентообладатель(и):

МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАРИАНТОВ Bet v 1

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Предложенный способ основывается на
преобразовании телец включения в растворимую
форму при использовании органических
денатурирующих реагентов, а также при
использовании хроматографических методов. При
хроматографии выбирают неорганические,
щелочные, солосодержащие элюенты. После

окончания очистки получают рекомбинантные
варианты Bet v 1 аллергена в форме, которая
может непосредственно использоваться для
медицинских целей. Преимущество способа
состоит в минимальной обработке образца,
использовании фармакологически совместимых
веществ, кроме этого в процессе очистки раствора
целевого белка эффективно удаляются
эндотоксины. 11 з.п. ф-лы, 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2003109430/13, 18.08.2001**(24) Effective date for property rights: **18.08.2001**(30) Priority:
08.09.2000 (cl.1-12) DE 10044360.5(43) Application published: **27.10.2004**(45) Date of publication: **20.05.2007 Bull. 14**(85) Commencement of national phase: **08.04.2003**(86) PCT application:
EP 01/09552 (18.08.2001)(87) PCT publication:
WO 02/20559 (14.03.2002)Mail address:
**101000, Moskva, per. M.Zlatoustinskij, 10,
kv.15, bjuro "EVROMARKPAT", I.A.Veselitskoj**

(72) Inventor(s):

**ZUKK Roland (DE),
KROMVELL' Oliver (DE),
FIBIG Khel'mut (DE)**

(73) Proprietor(s):

MERK PATENT GMBKh (DE)(54) **METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF Bet v 1 RECOMBINANT VARIANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention proposes a method based on transformation of inclusion bodies to a soluble form using organic denaturing reagents and chromatography methods. In carrying out chromatography inorganic, alkaline and salt-containing eluents are chosen. After termination of purification recombinant variants of allergen

Bet v 1 are prepared in form that can be used in medicinal aims directly. The advantage of method involves minimal treatment of a sample, using pharmacologically compatible substances and effective removing endotoxins in process of treatment of the end protein solution.

EFFECT: improved method of isolation and purification.

2 tbl, 1 ex

Изобретение касается способа растворения и очистки рекомбинантных белков, которые экспрессируются в бактериальных клетках-хозяевах и откладываются как нерастворимые агрегаты (тельца включения). Очистка основывается на превращении телец включения в растворимую форму при использовании органических денатурирующих реагентов и

хроматографических методов. В данной заявке описываются неорганические, щелочные, соледержащие элюенты, которые после окончания очистки дают возможность получить рекомбинантные белки после нейтрализации в доступной форме, которая может использоваться непосредственно для медицинских целей и которая является физиологически приемлемой. Способ частично приемлем для очистки аллергенов и фрагментов аллергенов.

Способ в соответствии с изобретением проводят в условиях, которые необходимы для получения фармацевтических препаратов (GMP). Фармацевтически активные ингредиенты могут использоваться непосредственно после растворения как препараты для парентерального введения. Предпочтительные рекомбинантные аллергены или варианты аллергенов, которые получают способом в соответствии с изобретением, могут использоваться как для усовершенствованной терапии, так и для диагностики аллергических заболеваний.

Общей проблемой приготовления рекомбинантных белков при использовании бактериальных и прокариотических клеток-хозяев, таких как, например, *E. coli*, является то, что экспрессированные белки не обладают правильной или природной укладкой, которая обычно требуется для проявления полной биологической активности. Неправильная укладка часто приводит к получению ряда белков, которые находятся в форме, являющейся нерастворимой в экспрессионной среде или откладываются в форме агрегатов, которые известны в научной литературе как, так называемые, "тельца включения". Образование указанных "телец включения" имеет вредное влияние на очистку и необходимую растворимость экспрессированного рекомбинантного белка (Marston et al, 1986, Biochem J.240: 1-12). Для того чтобы очистить рекомбинантные белки, которые в виде отложений содержатся в бактерии, к хроматографическим элюентам часто добавляют денатурирующие вещества, такие как, например, мочевины или гидрохлорид гуанидина.

Однако эти добавки не могут совмещаться с каждым принципом разделения, таким как, например, хроматография на основе гидрофобного взаимодействия. Кроме того, продукты могут быть модифицированы неблагоприятным образом химическими реагентами, такими как, например, цианат, который может образовываться в растворах мочевины. Удаление денатурирующего агента, и, таким образом, возможная ренатурация, часто выполняются путем диализа, диафильтрации или гель-фильтрации. Эти процессы являются не только длительными, но и часто приводят к повторной преципитации продуктов. Аналитическое определение и полное удаление указанных выше денатурирующих агентов из конечного продукта являются сложными. Проблема, описанная выше, представляется особенно важной при получении и очистке рекомбинантных аллергенов и вариантов аллергенов.

Количество аллергий первого типа значительно выросло во всем мире в последние десятилетия. До 20% популяции населения в промышленно развитых странах страдает от таких заболеваний, как аллергический ринит, конъюнктивит или бронхиальная астма, которые вызваны аллергенами, присутствующими в воздухе (аэроаллергенами), которые высвобождаются из различных источников, таких как растительная пыльца, клещи, млекопитающие (коты, собаки, кони) и плесневые грибки. Тяжелые аллергии могут инициироваться укусами насекомых, таких как, например, пчелы и осы.

Вещества, которые инициируют аллергию первого типа, являются белками, гликопротеинами или полипептидами. После поглощения через слизистые оболочки или после укусов эти аллергены реагируют с IgE антителами, которые размещаются на поверхности тучных клеток у чувствительных особей. Если два или более IgE антител связаны друг с другом посредством аллергена, то это приводит к выделению медиаторов (например, гистамина, простагландинов) и цитокинов эффекторной клеткой и, таким образом, приводит к инициации аллергических симптомов. При помощи

последовательностей кДНК возможно получать рекомбинантные аллергены, которые могут использоваться при диагностике и терапии аллергий (Scheiner und Kraft, 1995, Allergy 50, 384-391). Рекомбинантные аллергены могут приобретать особую значимость в методах диагностики, поскольку, в отличие от обычных экстрактов, они дают возможность

5 идентифицировать индивидуальный спектр IgE чувствительности. Кроме того, возможно получать специфические генно-инженерные модификации рекомбинантных аллергенов, что дает возможность достичь уменьшенного аллергенного потенциала при отсутствии изменения реактивности с регуляторными клетками Т-хелперов (Schramm et al, 1999, J. Immunol., 162 (4): 2406-2414, Valenta et al., 1999, Biol. Chem. 380: 815-24; Singh et al, 1999, Int. Arch. Allergy Immunol. 119: 75-85). Варианты аллергенов этого типа предлагаются как будущие кандидаты для специфической иммунотерапии аллергии первого типа. В частности, недавно полученные модифицированные аллергены представляют собой предмет способа в соответствии с данным изобретением.

В этой связи получение рекомбинантных аллергенов и вариантов аллергенов в 15 бактериальных экспрессионных системах часто является особо важным. По сравнению с эукариотическими системами эти системы дают то преимущество, что высокий выход продукта получают в течение короткого времени экспрессии. Кроме того, они являются существенно безопасными с фармакологической точки зрения в отношении вирусной контаминации и онкогенов. Однако при рекомбинантном способе получения в 20 бактериальных экспрессионных системах основные аллергены различного происхождения, такие как, например, группа 1 (Vrtala et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97: 781-7) и 13 (Suck et. al, 2000, Clin Exp. Allergy 30: 324-332), аллергены луговых трав, Der f2 аллергены клещей (Iwamoto et al., 1996, Int. Arch. Allergy Immunol. 109: 356-61) и аллергены фосфорилазы A2 и гиалуронидазы токсинов насекомых (Soldatova et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 101: 691-8; Kuchler et al., 1989, Eur. J. 25 Biochem. 184: 249-254), откладываются в клетках-хозяевах как тельца включения. Варианты аллергенов, такие как, например, фрагменты или мультимеры человеческого аллергена пыльцы березы Bet v 1 (фрагмент А, фрагмент В, Bet v 1 тример) также ведут себя подобным образом, несмотря на то, что немодифицированный рекомбинантный 30 аллерген Bet v 1 является существенно растворимым (Hoffmann-Sommergruber et al., 1997, Prot. Expr. Purific. 9: 233-39; van Hage-Hamsten et al., 1999, J. Allergy Clin. Immunol. 104: 969-7).

Объект, таким образом, обеспечивает способ, который предоставляет возможность очистки рекомбинантных белков в форме "тельца включения" определенных аллергенов или 35 белков, имеющих аллергенное действие, простым и эффективным способом, в то время как он свободен от указанных выше недостатков способов предшествующего уровня техники. Кроме того, объект заключается в изоляции белков таким образом, чтобы во время, а особенно в конце очистки, они пребывали в форме, которая дает им возможность стать доступными непосредственно и без дальнейшей обработки для медицинского или 40 диагностического использования.

Данное изобретение представляет собой биохимический способ очистки, который посредством эффективного одно- или многоступенчатого, преимущественно одно- - 45 трехступенчатого метода очистки приводит к получению чистых форм белков из рекомбинантных белков, находящихся после экспрессии в форме телец включения, при использовании существенно небуферированных щелочных элюентов.

Изобретение также представляет собой способ, в котором рекомбинантные белки в дальнейшем остаются в растворе при быстрой нейтрализации после заключительного этапа очистки. В то же время таким образом получают физиологическую среду.

В частности, способ особенно оптимизирован для получения рекомбинантных 50 аллергенов и вариантов аллергенов. Способ представляет собой общее применение для этих первичных продуктов экспрессии. Аллергены и варианты аллергенов из других источников, экспрессируемые, главным образом, как тельца включения, могут также очищаться таким образом, подвергаться ренатурации и вводиться в состав рецептур.

Для целей изобретения термин "варианты аллергенов" предназначен для обозначения фрагментов, мультимеров, таких как, например, димеры или тримеры, а также модификаций исходных аллергенов или их фрагментов/мультимеров. Для целей изобретения последние могут иметь вставки, делеции или замены одной или более

5 аминокислот.

Предпочтение отдается вариантам рекомбинантных аллергенов, которые не существуют в природе и которые не имеют или имеют сниженную IgE активность, но при этом сохраняют Т-клеточную активность. Способ особенно приемлем для изоляции вариантов аллергенов основного аллергена пыльцы березы Bet v 1, а именно фрагментов А

10 (аминокислоты 1-74) и В (аминокислоты 75-164) и рекомбинантного тримера.

Рекомбинантные аллергены и варианты аллергенов, получаемые таким способом, являются в высшей степени приемлемыми для использования в специфической терапии и диагностике аллергических заболеваний.

Изобретение, таким образом, связано со способами получения очищенных

15 рекомбинантных белков в растворимой, биологически активной форме как

физиологической среды, которая является непосредственно приемлемой для медицинского использования, из белковых агрегатов ("телец включения"), получаемых в результате бактериальной экспрессии, и которые являются нерастворимыми в экспрессионной среде, при этом указанный способ может быть описан следующими этапами:

20 (i) помещение выделенных нерастворимых белковых агрегатов в органические денатурирующие реагенты,

(ii) очистка раствора, полученного на этапе (i), посредством, по крайней мере, одного хроматографического этапа при использовании существенно неорганического небуферированного щелочного, солесодержащего элюента, и

25 (iii) нейтрализация щелочного раствора, полученного после этапа заключительной очистки, при этом раствор содержит растворенный, ренатурированный и биологически активный белок.

Для очистки первоначально образованные нерастворимые агрегаты, прежде всего, растворяют в денатурирующих реагентах, которые сами по себе являются известными и, таким образом, указанные агрегаты подвергают денатурации. Предпочтение отдается

30 использованию мочевины, в частности 5-10 М мочевины, желательно 8 М мочевины.

Альтернативно также могут использоваться другие агенты, такие как, например, относительно высококонцентрированный раствор гидроокиси натрия или калия (0,2-1 М) или упомянутый выше гидрохлорид гуанидина.

35 На последующем этапе растворенный, денатурированный белок связывается с приемлемым хроматографическим материалом. В основном, приемлемыми в данной заявке являются ионитовые фильтры, предпочтительно анионитовые фильтры.

Хроматографический элюент, который используется в соответствии с изобретением, представляет собой неорганический, небуферированный, щелочной, солесодержащий

40 раствор. Приемлемыми элюентами являются растворы, например, NaOH или KOH вместе с NaCl или KCl. Если это желательно, а также в предпочтительном воплощении добавляют гидрокарбонат натрия или гидрокарбонат калия. Желательно, чтобы элюенты содержали NaOH, NaCl или NaOH, NaCl и NaHCO₃. Водный щелочной раствор в соответствии с изобретением имеет содержание NaOH или KOH от 5 mM до 50 mM (моль/л),

45 предпочтительно от 15 до 25 mM, в частности 20 mM. Концентрация соли (например, NaCl) сначала является относительно низкой, пока белок крепко не связывается с ионообменным материалом. Начальная концентрация соли в соответствии с изобретением находится между 6 и 60 mM, предпочтительно между 15 и 30 mM, в частности 20 mM. Благодаря этому удаляют денатурирующий агент и загрязняющие включения, которые не связались или не

50 связаны достаточно прочно с хроматографическим материалом. Если добавляют NaHCO₃, то содержание составляет от 5 до 15 mM, предпочтительно 11 mM.

Таким образом, изобретение относится к соответствующему способу, в котором денатурирующий реагент удаляется из денатурирующего раствора путем связывания

растворенного рекомбинантного белка с хроматографическим материалом и замены денатурирующего раствора существенно неорганическим, небуферированным, щелочным элюентом, имеющим концентрацию соли, которая обеспечивает связывание белка с указанным материалом обменника.

5 Для того чтобы элюировать связанный рекомбинантный белок, в соответствии со способом по данному изобретению более высокие концентрации соли (NaCl и KCl) обеспечиваются путем создания градиента, при этом другие условия остаются такими же. Предпочтительно использовать линейный градиент между 20 mM NaCl (KCl) (начальное значение) и 0,5 M NaCl (конечное значение) Таким образом восстанавливают не только
10 желаемый белок, но также отделяют его от других загрязнений (например, от других белков).

Таким образом, изобретение относится к соответствующему способу, который характеризуется тем, что рекомбинантный белок элюируется и освобождается от загрязнений путем увеличения концентрации соли, такого увеличения концентрации соли
15 предпочтительно можно достичь при помощи создания градиента.

В ряде случаев этого оказывается достаточно и можно будет не продолжать далее этап очистки, поскольку элюированный белок является в достаточно степени очищенным в соответствии с требованиями В таких случаях этап нейтрализации, описанный более подробно ниже, проводят непосредственно после для того, чтобы получить готовый к
20 употреблению активный белок.

В противном случае, в соответствии со способом выполняют последующий этап хроматографии. Все известные способы хроматографии могут использоваться в данном изобретении. Более подробно, это будет зависеть от химических/физических свойств
25 определенного белка, который подвергают очистке. Предпочтительно, в частности в случае аллергенов и вариантов аллергенов Bet v 1 типа, проводить дальнейшую очистку путем хроматографии на основе гидрофобных взаимодействий. Альтернативно, вместо этого также может использоваться гель-фильтрацию.

В предпочтительном воплощении способ в соответствии с изобретением представляет собой трехэтапный способ, который включает ионо-обменную хроматографию,
30 хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия и гель-фильтрацию, предпочтительно в установленной последовательности. Однако это не означает ограничения способа в соответствии с изобретением.

Таким образом, изобретение также относится к соответствующему способу, который включает, по крайней мере, один хроматографический этап, предпочтительно
35 хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия и/или гель-фильтрацию.

Для данного изобретения является существенным на всех этапах очистки, что их проводят с тем же качественным и количественным составом композиции элюентов, которая уже была описана выше: NaOH, NaCl и предпочтительно NaHCO₃ или соответствующие производные калия. Только концентрация компонента хлорида натрия
40 может колебаться в широких пределах на различных этапах. Таким образом, например, в хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия может использоваться концентрационный градиент NaCl (KCl) от высокого (1-3 M, предпочтительно, 2 M) до низкого (30-10 mM, предпочтительно 20 mM). Заключительная концентрация в данном случае коренным образом зависит от желаемой концентрации соли после заключительного
45 этапа очистки. Эта концентрация в соответствии с изобретением является физиологически допустимой концентрацией раствора. Если, к примеру, гель-фильтрация представляет собой заключительный этап очистки предпочтительного трехэтапного способа очистки, то используется концентрация NaCl в пределах приблизительно 150 mM. Кроме того, предпочтительную конечную концентрацию соли после заключительного этапа можно также
50 контролировать путем разведения или добавления соли, это, в свою очередь, зависит от количеств целевого белка, который подвергают хроматографии.

После заключительного этапа очистки - гель-фильтрации - в предпочтительном воплощении способа раствор нейтрализуют или белок ренатурируют путем добавления

разбавленной кислоты, предпочтительно HCl, при pH, которое устанавливается на уровне 6,5-8,0. Раствор с активным рекомбинантным белком может теперь, в случае необходимости, после последующей доводки содержания соли (например, Na⁺) и содержания белка, непосредственно использоваться в препаративной форме.

Таким образом, изобретение связано с соответствующим способом, который характеризуется тем, что нейтрализацию выполняют в интервале pH между 6,5-8,0 после окончания очистки с помощью разведенной кислоты, в частности, предпочтительным является использование разведенной HCl.

Способ в соответствии с изобретением описывается более подробно ниже с использованием примера изоляции вариантов аллергена основного аллергена пыльцы березы Bet v 1, а именно рекомбинантных фрагментов A (аминокислоты 1-74) и B (аминокислоты 75-164) и рекомбинантного тримера.

Для очистки изначально нерастворимые агрегаты денатурируют, предпочтительно в 8 М мочеvine. Альтернативно, могут использоваться также другие агенты, например, 0,2 М раствор гидроокиси натрия.

Первый этап хроматографической очистки выполняют посредством анионообменной хроматографии, например, при использовании источника Q. При этом большинство аллергенов или вариантов аллергенов связываются с носителем и переносятся в элюент при помощи исходного денатурирующего раствора. Щелочной элюент служит причиной того, что белки остаются в растворе. Элюирование градиентом NaCl вызывает частичное удаление бактериального загрязнения и активных фрагментов ингредиентов.

На двух последующих этапах очистки, хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия и гель-фильтрации, предварительно очищенные и уравновешенные аллергены или варианты аллергенов являются существенно свободными от бактериального загрязнения, которое еще осталось. С этой целью используются существенно те же элюентные вещества, состоящие из основания низкого молекулярного веса и варьирующего содержания неорганической соли. Таким образом, изобретение связано со специфической элюентной системой, в которой рекомбинантные белки, подвергаемые очистке, содержатся в растворе при мягких условиях во время очистки, и которая приводит к его эффективной очистке. После заключительного хроматографического этапа очищенные рекомбинантные белки могут в соответствии с изобретением быть изолированы в растворимой форме или ренатурированы простой нейтрализацией основы, которая присутствует в элюенте, при использовании соответствующей кислоты. Сделав приемлемый выбор концентрации элюентных добавок, готовят физиологический раствор, который является приемлемым для парентеральных препаратов. Очищенные рекомбинантные аллергены или варианты аллергенов идентифицируются при использовании их известных физических, химических, иммунологических или биологических свойств, в частности, при использовании изоэлектрического фокусирования, SDS-ПАГЭ и специфических моноклональных антител, а также IgE антител больных аллергией. Растворитель тестируется с помощью измерения pH, оценки количества Na⁺ и Cl⁻ и, в случае необходимости, концентрации CO₃. Эти способы общеизвестны и описаны. Выход рекомбинантных аллергенов или вариантов аллергенов в очищенной форме и растворенных в соответствии с изобретением составляет 75-95% по отношению к исходному белку.

Аллергенные компоненты, приготовленные таким образом, могут использоваться при *in vivo* и *in vitro* диагностике как часть процесса идентификации, дающего возможность выявить аллергенный компонент спектра пациент-специфической чувствительности, а также для специфической иммунотерапии аллергий. Кроме того, фармацевтические композиции в форме препаратов длительного хранения могут быть приготовлены превращением очищенных рекомбинантных белков.

Предпочтительный вариант воплощения способа в соответствии с изобретением представлен на диаграмме, приведенной ниже (Таблица 1):

Таблица 1

Изоляция телец включения

Денатурация, например, в 8 М мочеvine

Анионообменная хроматография, например, при использовании источника Q

Раствор А: 20 мМ NaOH, 20 мМ NaCl, 11 мМ NaHCO₃

Раствор В: 20 мМ NaOH, 0,5 М NaCl, 11 мМ NaHCO₃

5

(Необязательно) хроматография на основе гидрофобного взаимодействия, например, при использовании источника RHE

Раствор А: 20 мМ NaOH, 2 М NaCl, 11 мМ NaHCO₃

Раствор В: 20 мМ NaOH

(Необязательно) гель-фильтрация, например, Superdex 75

Раствор А: 10 мМ NaOH, 11 мМ NaHCO₃, 148,4 мМ NaHCO₃

10

Ренатурирующая композиция I

Целевой белок в 10 мМ NaOH, 148,4 мМ NaCl, 11 мМ NaHCO₃ + добавление 100

мМ HCl к 10 мМ = растворимый целевой белок в 0,154 М Na⁺ растворе

Таким образом, можно наблюдать следующее: данное изобретение позволяет при
использовании способа в соответствии с изобретением сделать возможным посредством
специфической композиции хроматографических элюентов, выбора хроматографической
среды, установления специфического pH и, таким образом, содержания соли,
технологически и фармакологически осуществимого способа изоляции высокоочищенных,
растворимых рекомбинантных аллергенов или вариантов аллергенов, которые
первоначально готовят как нерастворимые агрегаты, достичь способа, который требует
незначительных трудозатрат и времени. Поскольку условия, при которых рекомбинантные
белки очищают и ренатурируют или растворяют, являются мягкими и фармакологически
более приемлемыми по сравнению с известными способами, активные ингредиенты можно
использовать как для диагностики, так и для парентеральной терапии аллергических
заболеваний.

Пример

Изоляция растворимых вариантов аллергена Bet v 1 (терапевтически эффективные
варианты аллергенов рекомбинантного Bet v 1, фрагменты А и В, тример Bet v 1)

Тельца включения вариантов аллергенов, очищенные с помощью стандартных
способов, предпочтительно денатурируют в 8 М мочеvine, 20 мМ Трис/HCl. После
завершения денатурации проводят фильтрацию, предпочтительно через фильтр с
размером пор 0,22-0,45 мкм, или центрифугирование, предпочтительно 5-15 минут при
10,000-20,000×g. Осветленный раствор используют для ионно-обменной хроматографии с
источником 15 Q (Pharmacia), при использовании материала носителя, который
уравновешен щелочным раствором, предпочтительно 20 мМ NaOH, 11 мМ NaHCO₃ и 20
мМ NaCl. Материал твердого носителя должен быть стабильным при значениях pH до 12,0.
Относительно высокое значение pH исходного раствора является причиной того, что
фактически все целевые белки связываются с анионным обменником. Исключение
составляют очень редкие белки, изоэлектрическая точка которых выше 11,0. Промывание
иммобилизованных белков начальным раствором эффективно удаляет денатурирующий
раствор (например, 8 М мочеvinu) и фармакологически нежелательные буферные
вещества (например, Трис). Этот способ обеспечивает тот факт, что замена
растворителем, который улучшает последующие этапы разделения, происходит при
сохранении растворимости рекомбинантных белков. Последующее элюирование
выполняют с помощью повышающегося градиента NaCl, например от 20 мМ NaOH, 11 мМ
NaHCO₃, 20 мМ NaCl до 20 мМ NaOH, 11 мМ NaHCO₃, 0,5 М NaCl, это приводит к
отделению загрязнений (белки клетки-хозяина) и активных фрагментов ингредиентов.

Последующий хроматографический этап представляет собой хроматографию на основе
гидрофобных взаимодействий (только для фрагментов). С этой целью элюат этапа 1
доводят до высокой молярности солевого раствора, например, 5 М NaCl и 20 мМ NaOH, 11
мМ NaHCO₃, и таким образом связывают целевые белки. Элюирование связанного белка
проводят с помощью щелочного раствора, который содержит низкую концентрацию соли
или не содержит соли, например 20 мМ NaOH. Твердый материал носителя, используемый

для хроматографии на основе гидрофобных взаимодействий, должен быть также стабильным по отношению к щелочи до значения pH 12, как, например, источник PHE.

На третьем этапе гель-фильтрацию, например, с помощью Superdex 75, проводят при щелочных условиях. Хроматографический раствор выбирают таким образом, что

нейтрализация основания, прибавленного к элюенту, приводит к желаемой заключительной композиции, как, например, 10 mM NaOH, 11 mM NaHCO₃, 148,4 mM NaCl.

Элюат, полученный в результате гель-фильтрации, в заключение нейтрализуют, используя кислоту, соответствующую использованному основанию, посредством чего, с одной стороны, устанавливается нейтральное значение pH, и белок, таким образом, превращается в растворимую форму или ренатурируется и, с другой стороны, устанавливается желаемая концентрация соли посредством нейтрализации. Таким образом, например, раствор гель-фильтрации, который включает 10 mM NaOH, 11 mM NaHCO₃, 148,4 mM NaCl, превращают в физиологический раствор путем добавления 1/10 (об./об.) 100 mM HCl. Растворитель тестируют простым измерением pH и оценки количества Na⁺. Таким образом, способ в соответствии с изобретением предусматривает минимальную обработку образца, незначительную длительность обработки образца, использование исключительно фармакологически совместимых веществ, возможность использования отдельного элюента с минимальными вредными принципами разделения, возможность избежать длительных и, при определенных обстоятельствах, несостоятельных способов, таких как диализ. В дополнение, раствор гидроокиси натрия, который известен как эффективный бактериостатик, предохраняет присутствующие белки от деградации или контаминации микроорганизмами. Эндотоксины, которые могут вызвать проблемы при бактериальной экспрессии, также эффективно удаляются или подвергаются деградации. Последовательность и количество хроматографических этапов, описанных выше, может изменяться в зависимости от специфических физико-химических свойств целевых белков. Обзор растворов представлен в Таблице 2.

Нейтрализация/растворение после гель-фильтрации:

- медленное добавление 1/10 объема (основываясь на исходной смеси) 100 mM HCl.

Например, в 100 мл исходного раствора содержится:

10 mM NaOH, 148,4 mM NaCl, 11 mM NaHCO₃

после нейтрализации 110 мл

11 mM NaHCO₃ × 10/11 = 10 mM NaHCO₃

10 mM NaOH/HCl(NaCl) × 10/11 = 9,1 mM NaCl

148,4 mM NaCl × 10/11 = 134,9 mM NaCl

Заключительный раствор соответственно включает 154 mM Na⁺, 144 mM Cl⁻ и 10 mM CO₃⁻.

Таблица 2				
Растворы для хроматографического разделения вариантов Bet v 1				
Хроматогр. белок	Применяемый образец	Раствор А	Раствор В	Градиент
AIRX				
Фрагмент 1	8 М мочевины, 20 mM Трис/HCl pH 8.0	20 mM NaOH, 10 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	20 mM NaOH, 500 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	10 ОК
Фрагмент 2	смотри выше	смотри выше	смотри выше	смотри выше
Тример	смотри выше	смотри выше	20 mM NaOH, 800 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	смотри выше
HIC				
Фрагмент 1	набор AIEХ пула до 2 М NaCl	20 mM NaOH, 2 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	20 mM NaOH	10 ОК

Хроматогр. белок	Применяемый образец	Раствор А	Раствор В	Градиент
Фрагмент 2	набор AIEХ пула до 3 М NaCl	20 mM NaOH. 3 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	20 mM NaOH	10 ОК
Тример	-	-	-	-

Гель-фильтрация				
Фрагмент 1	Н1С пул	10 мМ NaOH, 148,4 мМ NaCl, 11 мМ NaHCO ₃	-	-
Фрагмент 2	смотри выше	смотри выше	-	-
Тример	Q пул	смотри выше	-	-

5 Все растворы и фракции сохранялись при комнатной температуре (ОК = объем колонки).

Формула изобретения

1. Способ получения следующих очищенных рекомбинантных вариантов Bet v 1
аллергена: тримера, фрагмента А (аминокислота 1-74) и фрагмента В (аминокислота 75-
10 164), из телец включения, полученных в результате бактериальной экспрессии, которые
являются нерастворимыми в экспрессионной среде, отличающийся тем, что включает
следующие этапы:

- (i) помещение выделенных нерастворимых телец включения в органические
денатурирующие реагенты,
- 15 (ii) очистку раствора, полученного на этапе (i) путем, по крайней мере, одного
хроматографического этапа при использовании по существу неорганических,
небуферированных, щелочных, солесодержащих элюентов, содержащих NaOH, NaCl,
NaHCO₃, KOH, KCl и/или KHCO₃, причем если применяют более чем один этап
хроматографии, на этих этапах используют одинаковый качественный и количественный
20 состав композиции элюентов с концентрационным градиентом компонента NaCl и/или KCl в
пределах от 1-3 М до 30-10 мМ в случае хроматографии на основе гидрофобного
взаимодействия,
- (iii) нейтрализацию щелочного раствора, полученного в результате заключительного
этапа очистки, при этом указанный раствор содержит растворенный, денатурированный и
25 биологически активный белок.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что эти рекомбинантные варианты не имеют или
имеют сниженную IgE активность, но сохранили Т-клеточную активность.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что используемым денатурирующим
реагентом является гидрохлорид гуанидина.

30 4. Способ по пп.1-3, отличающийся тем, что используемый денатурирующий реагент
удаляют из денатурирующего раствора путем связывания растворенного рекомбинантного
белка с хроматографическим материалом и замены денатурирующего раствора на
неорганический, небуферированный, щелочной элюент, который имеет концентрацию соли,
обеспечивающую связывание белка с указанным материалом обменника.

35 5. Способ по п.4, отличающийся тем, что связанный рекомбинантный белок элюируют с
помощью увеличивающейся концентрации соли и в процессе обработки освобождают от
загрязнений.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что увеличения концентрации соли достигают
путем создания градиента.

40 7. Способ по любому из пп.4-6, отличающийся тем, что используемый
хроматографический материал представляет собой анионитовый фильтр.

8. Способ по любому из пп.4-7, отличающийся тем, что проводят, по крайней мере,
один дальнейший этап хроматографической очистки.

45 9. Способ по п.8, отличающийся тем, что проводимый этап дальнейшей
хроматографической очистки представляет собой хроматографию на основе гидрофобного
взаимодействия и/или гель-фильтрацию.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что используемый
хроматографический элюент представляет собой NaOH, NaHCO₃ и NaCl.

50 11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что нейтрализацию проводят
после окончания очистки в интервале pH между 6,5-8,0.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что HCl используют для нейтрализации.