

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

209 651 B

(21) A bejelentés száma: 4388/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 05. 10.
(30) Elsőbbségi adatok:
364 846 1989. 06. 12. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/02652
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 90/15876

(51) Int. Cl.⁵

C 12 P 21/02

(40) A közzététel napja: 1992. 11. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1994. 09. 28. SZKV 94/09

(72) Feltalálók:

Barker, Ray E., Terre Haute, Indiana (US)
Mehrotra, Vikram P., Terre Haute, Indiana (US)

(73) Szabadalmas:

Pitman-Moore Inc., Terre Haute, Indiana (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Eljárás rekombináns fehérjék kinyerésére

(57) KIVONAT

A találmány értelmében rekombináns fehérjéket olyan fehérjeoldatokból, amelyek nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket tartalmaznak, úgy nyernek ki, hogy közvetlenül a fehérjeoldathoz amint vagy kvaterner ammónium-vegyületet adnak a nagy molekulatö-

megű fehérjék szelektív kicsapásához szükséges mennyiségben. A csapadékot eltávolítják, és az oldatot az adott esetben jelenlevő kis molekulatömegű szennyező fehérjék és nem-fehérje szennyezőanyagok eltávolítására tovább feldolgozzák.

A találmány tárgya általános eljárás rekombináns fehérjék kinyerésére, különösen olyan oldatokból, amelyek szennyezőanyagként nagy molekulatömegű fehérjéket tartalmaznak.

Rekombináns fehérjék előállítására szolgáló eljárások jól ismertek a szakterületen. Ezen eljárások fő jellemzője, hogy egy bizonyos fehérjét kódoló heterológ DNS-szegmenst juttatnak be egy gazdaszervezetbe. A transzformált mikroorganizmust olyan körülmények között tenyésztik, amelyek elősegítik a fehérjék kifejlődését. Ilyen módon például inzulin, szomatotropinok, interleukinok, interferonok, szomatomedinek stb. állíthatók elő heterológ formában.

Gyakran előfordul azonban, hogy a transzformáns mikroorganizmusok által termelt heterológ fehérjék biológiaiailag nem aktívak mivel a mikroorganizmusban átférdozva nem veszik fel a megfelelő tercier szerkezetet (nem hajtogatódnak). A heterológ fehérjék hajlamosak aggregátumokat képezni, amelyek a sejten belül „zárványtest” formájában figyelhetők meg. Ezen zárványtestek képződését az is okozhatja, hogy különböző fehérjemolekulák között kovalens intermolekuláris diszulfidhidak alakulnak ki, ami oldhatatlan komplexek képződését eredményezi. A zárványtestek általában főleg heterológ fehérjéket és kis mennyiségű, a gazda mikroorganizmus fehérjeiből álló szennyezőanyagot tartalmaznak.

Kidolgoztak már eljárásokat zárványtesteknek mikroorganizmusokból történő extrahálására és az azokban található heterológ fehérjék olyan fehérjékké történő átalakítására, amelyeknek biológiai aktivitása a természetes, nem-rekombináns fehérjék aktivitásához hasonló, illetve közelálló. Ezek az eljárások általában abban állnak, hogy a mikroorganizmussejtet összezuzzák, a zárványtesteket a sejtörmeléktől elkülönítik, a zárványtesteket egy olyandenaturáló/detergens segítségével szolubilizálják, amely kihajtogatja a fehérjét, a heterológ zárványtest-fehérjéket elkülönítik az oldhatatlan szennyezőanyagoktól, a denaturáló/detergens anyagot eltávolítják, így a heterológ fehérje bioaktív tercier konformációba újrahajtogatódik, majd a fehérjét elválasztják a szennyező fehérjéktől, amelyek az oldatban maradnak.

Ezt az általános elvet követő tisztítási eljárás rekombináns fehérjék tisztítására ismeretes például a 4 511 503 és a 4 518 526. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokból. A 4 511 502 és a 4 620 948. lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások olyan többlepéses eljárást ismertetnek, amely szerint (1) a zárványtesteket erős denaturálószerben redukálószer jelenlétében szolubilizálják, (2) az oldhatatlan szennyezőanyagokat eltávolítják a szolubilizált protein oldatából, (3) az erős denaturálószer egy gyenge denaturálószerrel cserélik ki, (4) a fehérje újrahajtogatódását a szulfhidrilcsoportok diszulfid-hidakká történő oxidálásával segítik elő, amit molekuláris oxigénnel és katalizátorral, rendszerint fémkationokkal vagy nátrium-tetratióttal végeznek, és (5) a fehérjét membránelválasztással vagy kromatográfiásan elválasztják a szennyező fehérjéktől.

A 4 677 196 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás a fenti általános eljárás egy változatát ismerteti fehérjék tisztítására és aktiválására. Az eljárás szerint a zárványtesteket SDS-ben szolubilizálják, az oldatból a fölösleges SDS-t dialízissel vagy más alkalmas módszerrel eltávolítják, az SDS-fehérje oldatot anioncserélő gyantán kromatografálva a fehérjét kinyerik.

Ezek az eljárások ugyanazt a hátrányt mutatják, A denaturáló/detergens anyag eltávolításával kapott fehérje oldat tartalmazza a rekombináns fehérjét továbbá kis molekulatömegű szennyező fehérjéket, nem-fehérje szennyezőanyagokat és nagy molekulatömegű szennyezőanyagokat. A nagy molekulatömegű szennyezőanyagok sokszor dimerek, oligomerek és rekombináns fehérjék aggregátumai, de tartalmaznak a sejtliázumból származó nem-rekombináns fehérjéket is. Gyakran bonyolult, idő- és költségigényes a rekombináns fehérjéket elválasztani ezektől a szennyezőanyagoktól különösen a rekombináns proteinek dimerjeitől, oligomerjeitől és aggregátumaitól. A kromatográfiás és membránelválasztási módszerek hatékonyak lehetnek a rekombináns fehérjéknek a szennyezőanyagoktól való elválasztásában, azonban ezek a módszerek nehézkesek, hosszúak, drágák, és gyakran alacsony a fehérje kitermelése.

Szükség van tehát új, javított módszerre, amely a rekombináns fehérjék egyszerű, gyors, nem drága és nagy kitermelést eredményező kinyerését teszi lehetővé olyan oldatokból, amelyek nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagokat tartalmaznak.

A találmány tárgya a fentiek alapján új eljárás rekombináns fehérjék egyszerű, gyors, olcsó kinyerésére olyan oldatokból, amelyek nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket tartalmaznak.

A találmány tárgya másrészt eljárás nagy molekulatömegű szennyező fehérjék eltávolítására rekombináns fehérjék oldatából, ezáltal lehetővé téve rekombináns fehérjék egyszerű, gyors és olcsó kinyerését.

A kitűzött célok úgy érhetők el, hogy a nagy molekulatömegű fehérjéket és rekombináns fehérjét tartalmazó oldatokhoz amint vagy kvaterner ammónium-vegyületeket adunk, olyan mennyiségben, ami a nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagok szelektív kicsapását teszi lehetővé. Ezek a vegyületek a rekombináns fehérjék molekulatömegének 1,5-szörösénél nagyobb molekulatömegű fehérjéknek, különösen a rekombináns fehérje dimerjeinek, oligomerjeinek és aggregátumainak a kicsapódását idézik elő. A rekombináns fehérjét az oldatból ismert módon kinyerve a kívánt fehérje terméket állítjuk elő.

Az előnyös megvalósítási mód szerint az amint vagy kvaterner ammónium-vegyületet közvetlenül az oldathoz adjuk 0,01–2 térfogat% végső koncentrációig. A kicsapódott nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket szokásos módszerekkel, például szűréssel, centrifugálással stb. távolítjuk el az oldatból. A kapott fehérjeoldatból, amely a rekombináns proteint, kis molekulatömegű szennyező fehérjéket és más nem-fehérje szennyezőanyagokat tartalmaz, szokásos módszerek-

kel, például kromatográfiával végzett további feldolgozással a kívánt rekombináns fehérjét kinyerjük.

A „rekombináns fehérje” kifejezésen olyan fehérjét értünk, amelyet viszonylag tiszta formában kívánunk kinyerni, és amelynek az aminosav-szekvenciája megegyezik a natív protein aminosav-szekvenciájával illetve annak analógja, illetve olyan muteint értünk, amelynek aminosav szekvenciája a natív fehérje szekvenciájához képest helyettesítéseket, deléciókat, kicseréléseket vagy más módosításokat tartalmaz.

A „rekombináns szomatotropin” (rST) kifejezésen olyan rekombináns fehérjét értünk, amelynek aminosav-szekvenciája megegyezik a natív szomatotropinnal, ahhoz hasonló vagy annak lerövidített formája, továbbá olyan analógjait és muteinjeit értjük, amelyeknek szekvenciája helyettesítéseket, deléciókat, kicseréléseket vagy más módosításokat tartalmaz. rST lehet különösen olyan fehérje, amelynek a szekvenciája megegyezik a pST szekvenciájával, de amino-termiálisan aminosavat töröltünk. Ilyen fehérjék például a delta-7 rekombináns sertés szomatotropin, delta-4 rekombináns borjú szomatotropin stb.

A „nagy molekulatömegű szennyező fehérjék”, illetve a „nagy molekulatömegű protein szennyezőanyagok” kifejezésen olyan fehérjéket értünk, amelyeknek molekulatömege a rekombináns fehérjék molekulatömegének legalább 1,5-szöröse, különösen a rekombináns fehérje dimereket, oligomereket és aggregátumokat, amelyeknek molekulatömege a rekombináns proteinek molekulatömegének legalább 2-szerese.

A „kis molekulatömegű szennyező fehérjék”, illetve a „kis molekulatömegű fehérje szennyezőanyagok” kifejezésen olyan fehérjéket értünk, amelyeknek molekulatömege a rekombináns fehérjék molekulatömegénél legalább 1,5-ször kisebb.

A „nem-fehérje szennyezőanyagok” kifejezésen viszonylag kis molekulatömegű anyagokat értünk, például kicsapószerkeket, szolubilizálószerkeket, oxidálószerkeket, redukálószerkeket stb, amelyek előfordulnak a fehérjeoldatban.

A találmány értelmében rekombináns fehérjét nyerünk olyan fehérjeoldatból, amely nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket tartalmaz. Az eljárás abban áll, hogy a nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket és a rekombináns fehérjét tartalmazó oldathoz közvetlenül amint vagy kvaterner ammónium-vegyületeket adunk olyan mennyiségben, ami a nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyag szelektív kicsapódásához szükséges. Az amin illetve a kvaterner ammónium-vegyületek a rekombináns fehérje molekulatömegénél legalább 1,5-ször nagyobb molekulatömegű fehérjéknek, különösen a rekombináns fehérjék dimerjeinek, oligomerjeinek és aggregátumainak – amelyeknek a molekulatömege legalább 2-szer nagyobb, mint a rekombináns fehérje molekulatömege – kicsapódását segítik elő. Ez a módszer egy javított eljárás a rekombináns proteinek, gyors, egyszerű, nem drága és jó kitermeléssel történő kinyerésére olyan oldatokból, amelyek nagy molekulatömegű protein szennyezőanyagokat tartalmaznak.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósítási módja szerint rekombináns szomatotropinokat (molekulatömeg körülbelül 20 000) nyerünk ki olyan módon, hogy nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket és rekombináns szomatotropinokat tartalmazó oldathoz közvetlenül amint vagy kvaterner ammónium-vegyületeket adunk, olyan mennyiségben, ami a nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagok szelektív kicsapódását eredményezi. Az amin, illetve a kvaterner ammónium-vegyületek a rekombináns fehérje molekulatömegénél legalább 1,5-ször nagyobb molekulatömegű (kb. 30000-nél nagyobb molekulatömegű) fehérjéknek, különösen a rekombináns szomatotropinok dimerjeinek, oligomerjeinek és aggregátumainak – amelyeknek a molekulatömege legalább 2-szer nagyobb, mint a rekombináns szomatotropin molekulatömege (kb. 40000-nél nagyobb molekulatömeg) – kicsapódását segítik elő. Ez a módszer tehát lehetővé teszi a rekombináns szomatotropin elválasztását biológiai inaktív dimerjeitől, oligomerjeitől és aggregátumaitól.

A találmány szerinti eljárással feldolgozható, rekombináns fehérjét, nem-fehérje szennyezőanyagokat, nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagokat és kis molekulatömegű fehérje szennyezőanyagokat tartalmazó oldatok ismert módon állíthatók elő. A fehérje zárványtesteket, amelyeket transzformált mikroorganizmusok segítségével állítunk elő, a lipidek, sejtmembránok eltávolítására kezeljük, és a kapott, viszonylag tiszta, a rekombináns fehérjét és szennyező proteineket, különösen nagy molekulatömegű rekombináns dimereket, oligomereket és aggregátumokat tartalmazó zárványtesteket erős denaturálószerrel vagy detergenssel, például guanidin-hidrokloriddal, nátrium-dodecilszulfáttal (SDS), Tritonnal stb. szolubilizáljuk.

A kapott fehérjeoldatot elválasztjuk a nemoldható anyagoktól, és az erős denaturálószerrel, illetve detergenssel eltávolítjuk, így olyan fehérjeoldatot kapunk, amely a rekombináns fehérjét natív, bioaktív formájába újjahajtogatódva, továbbá nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagokat, kis molekulatömegű szennyező fehérjéket és más nem-fehérje szennyezőanyagokat tartalmaz. Az ilyen oldatok rendszerint 1–50 mg/ml összes fehérjét, és 0,05–4 mg/ml rekombináns fehérjét tartalmaznak.

A találmány értelmében ehhez az oldathoz amint vagy kvaterner ammónium-vegyületeket adunk, így kicsapjuk a nagy molekulatömegű szennyező fehérjéket.

Az amin vagy kvaterner ammónium-vegyületek adagolásának hatására kicsapódott nagy molekulatömegű szennyező proteineket az oldatból szokásos módszerekkel, például szűréssel, centrifugálással stb. távolítjuk el. A kapott proteinoldatot, amely a rekombináns fehérjét, esetlegesen kis molekulatömegű szennyező fehérjéket és más nem-fehérje szennyezőanyagokat tartalmaz, szükség esetén tovább feldolgozzuk a kis molekulatömegű szennyező fehérjék és más nem-fehérje szennyezőanyagok, például kicsapószerkeket, szolubilizálószerkeket, oxidálószerkeket, redukálószerkeket stb. eltávolítására. A nem-fehérje szennyezőanyagokat rendszerint dialízissal, kromatográfiával vagy más alkalmas

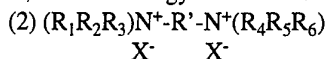
módszerrel távolítjuk el, míg a kis molekulatömegű szennyező fehérjéket a rekombináns proteinektől ioncserélő vagy másfajta kromatográfiával választjuk el.

A fehérjeoldat további feldolgozásával olyan fehérjét vagy fehérje-kompozíciót kapunk, amely kívánt felhasználásra vagy liofilizálásra alkalmas. Ennek módszerei jól ismertek.

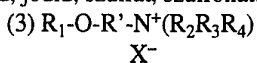
A találmány szerinti eljárásban alkalmazható amin vagy kvaterner ammónium-vegyület valamely a következő képletek valamelyikének megfelelő vegyület lehet:



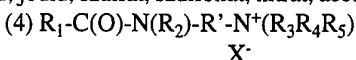
ahol R_1 , R_2 , R_3 és R_4 jelentése azonos vagy eltérő, egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben helyettesített 8–20 szénatomos alkilcsoport vagy hidrogénatom, feltételezve, hogy R_1 , R_2 , R_3 és R_4 közül legalább az egyik hidrogénatomtól eltérő, X jelentése egy anion, például klorid, bromid, jodid, szulfát, szulfonát, nitrát, acetát stb. vagy



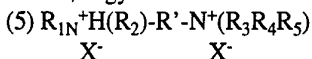
ahol R_1 jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben helyettesített 8–20 szénatomos alkilcsoport R_2 – R_6 jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú adott esetben helyettesített 8–20 szénatomos alkilcsoport vagy hidrogénatom, R' jelentése alkilén vagy anilén csoport, X jelentése egy anion, például klorid, bromid, jodid, szulfát, szulfonát, nitrát, acetát stb. vagy



ahol R_1 , R_2 , R_3 és R_4 jelentése azonos vagy eltérő, egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben helyettesített 8–20 szénatomos alkilcsoport vagy hidrogénatom, feltételezve, hogy R_1 , R_2 , R_3 és R_4 közül legalább az egyik hidrogénatomtól eltérő, R' jelentése alkilén- vagy arilén csoport, X jelentése egy anion, például klorid, bromid, jodid, szulfát, szulfonát, nitrát, acetát stb., vagy



ahol R_1 , R_2 , R_3 , R_4 és R_5 jelentése azonos vagy eltérő, egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben helyettesített 8–20 szénatomos alkilcsoport vagy hidrogénatom, feltételezve, hogy R_1 , R_2 , R_3 és R_4 közül legalább az egyik hidrogénatomtól eltérő, R' jelentése alkilén- vagy arilén csoport, X jelentése egy anion, például klorid, bromid, jodid, szulfát, szulfonát, nitrát, acetát stb., vagy



ahol R_1 , R_2 , R_3 , R_4 és R_5 jelentése azonos vagy eltérő, egyenes vagy elágazó szénláncú, adott esetben helyettesített 8–20 szénatomos alkilcsoport vagy hidrogénatom, R' jelentése alkilén- vagy arilén csoport, X jelentése egy anion, például klorid, bromid, jodid, szulfát, szulfonát, nitrát, acetát stb.

Előnyösen alkalmazható vegyületek például a dodecyl-amin-hidroklorid, trimetil-oktadecil-ammónium-klorid, trimetil-hexadecil-ammónium-klorid, trimetil-dodecyl-ammónium-klorid, dimetil-diammónium-klorid és a DUOMAC-T (N-faggyúalkil-1,3-diamino-pro-

pán-diacetát). Legelőnyösebb a DUOMAC-T (N-faggyúalkil-1,3-diamino-propán-diacetát) és a trimetil-dodecyl-ammónium-klorid.

A csapadékképzés elősegítéséhez szükséges amin és kvaterner ammónium-vegyület mennyisége a fehérje-koncentrációtól, a fehérje jellemzőitől, az adagolt vegyülettől függ, általában 0,01–2 térfogat% végső koncentrációig, előnyösen 0,01–0,5 térfogat% végső koncentrációig adagoljuk.

A találmány szerinti eljárással kinyerhető rekombináns fehérje lehet bármely, 5000-nél nagyobb molekulatömegű, transzformált mikroorganizmus által, rendszerint zárványtest formájában termelt fehérje. Ilyenek például a szomatotropinok, inzulinok, szomatomedinek, szomatostatinok, prolaktinok, placenta laktogének stb.

A találmány szerinti eljárással legelőnyösebben olyan rekombináns szomatotropinok nyerhetők ki, amelyeknek molekulatömege körülbelül 20000. A rekombináns szomatotropin bármely fajból származó rekombináns szomatotropin lehet, előnyösen azonban szarvasmarha, sertés, madár, juh vagy humán rekombináns szomatotropin, előnyösen sertés vagy szarvasmarha rekombináns szomatotropin.

Az említett rekombináns fehérjék előállítása jól ismert, például a 4 604 359 és a 4 332 717 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások humán rekombináns szomatotropin előállítását, a 4 443 739 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás rekombináns szomatotropinok előállítását, a 104 920 sz. európai szabadalmi bejelentés rekombináns sertés szomatotropin előállítását, a 4 443 359 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás rekombináns szarvasmarha szomatotropin előállítását, Schoner, Biotechnology 3(2), 151–54 rekombináns szomatotropin előállítását és Buell, Nucleic Acid Res. 13, 1923–38 (1985) rekombináns szomatomedin C előállítását ismerteti.

A 103 395 sz. közzétett európai szabadalmi bejelentés (közrebocsátva: 1985) egy transzformáns *E. coli* törzs konstruálását ismerteti, amely egy olyan első plazmidot tartalmaz, amely a delta-9-(Ser)-szomatotropint (olyan szomatotropin, amelyből 9 N-terminális aminosav hiányzik, de egy hozzáadott szerin-maradékot tartalmaz az N-terminálison) kódolja a lambda-PL promotér-operátor szabályozása alatt, amely egy a mukteriofágból származó Shine-Dalgarno területet tartalmaz. A transzformáns egy második, pcI857 plazmidot is tartalmaz, amely a pcI857 hőmérséklet-érzékeny represszor-fehérje termelését kódolja. A represszor-fehérje inaktíválható úgy, hogy a hőmérsékletet kb. 42 °C-ra emeljük, így a delta-9-(Ser)-szarvasmarha szomatotropin kifejeződését indukáljuk. Az *E. coli* HB101 (PL-mudelta-9-(Ser)-szarvasmarha szomatotropin és pcI857) transzformáns törzs ATCC 53030 számon letétbe van helyezve a The American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) intézetnél.

Hasonló transzformáns törzs, amely a delta-7-sertés szomatotropin (sertés szomatotropin, amelynek 7 N-terminális aminosava hiányzik) termelését ismerteti a 104920 sz. közrebocsátott európai szabadalmi bejelen-

tés (közrebocsátva: 1985.) Az E. coli HB101 (PL-mu-delta-7-sertés szomatotropin és pc1857) transzformáns törzs ATCC 53031 számon letétbe van helyezve a The American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) intézetnél.

Az ATCC 53030 és 53031 törzs hatékonyan termeli a delta-9-(Ser)-szarvasmarha szomatotropint, illetve a delta-7-sertés szomatotropint. A kifejeződött fehérje mindkét esetben a sertés szomatotropint. A kifejeződött fehérje mindkét esetben a sejten belül oldhatatlan, biológiailag inaktív, mikroszkóppal látható zárványtestek formájában képződik. Jól ismertek más módszerek sok hasonló fehérje előállítására.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósítási módja szerint mintegy 1–50 mg/ml teljes fehérjetartalmú és mintegy 0,05–2 mg/ml rekombináns szomatotropin-tartalmú oldatot mintegy 0,08–0,12 térfogat% DUOMAC-T-vel kezelünk a nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagok kicsapására. A csapadékot centrifugálással eltávolítjuk, és a kapott oldatból a rekombináns szomatotropint szokásos módon, ahogyan az előbbieken ismertettük, kinyerjük.

Bár a fenti kinyerési módszer rekombináns fehérjék kinyerésére vonatkozik a módszer ugyanúgy alkalmazható nem-rekombináns fehérjék elválasztására és kinyerésére is. Így például egy (1) „hasznos vagy kívánt fehérjét”, (2) nagy molekulatömegű fehérjét (molekulatömeg legalább 1,5-ször nagyobb, mint a hasznos fehérje molekulatömege) és (3) kis molekulatömegű fehérjét (molekulatömeg kisebb, mint a hasznos fehérje molekulatömegének 1,5-szöröse) tartalmazó oldat találmány szerinti kezelésével kicsapjuk a nagy molekulatömegű proteinek, így a nagy molekulatömegű fehérjét elválasztjuk a hasznos fehérjéktől és a kis molekulatömegű proteinektől. A nagy molekulatömegű fehérjét elválasztjuk az oldattól, és eldobjuk, vagy kívánt esetben tovább feldolgozzuk. A nagy molekulatömegű fehérjék kinyerhetők a csapadékból úgy, hogy a csapadékot újra feloldjuk, és az oldatból kinyerjük a fehérjét.

A hasznos fehérjét szokásos módszerrel elválasztjuk a kis molekulatömegű fehérjéktől, és kívánt esetben tovább feldolgozzuk vagy eldobjuk. A kis molekulatömegű fehérjét rendszerint kromatográfiásan vagy más, hasonló molekulatömegű fehérjék elválasztására alkalmazható eljárással választjuk el a hasznos fehérjétől. Az ilyen fehérjeelválasztási eljárások jól ismertek, és alkalmazhatók a találmány szerinti eljárásban.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal és a mellékelt ábrával szemléltetjük.

A mellékelt 1. ábra a DUOMAC-T koncentrációjának és a polimer/monomer (P/M) aránynak a sertés szomatotropin kitermelésére gyakorolt hatásának grafikus ábrázolása, gélpermeációs kromatográfiával (GPC) mérve.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal és a mellékelt ábrával szemléltetjük.

A kísérletekben alkalmazott zárványtesteket olyan transzformált E. coli törzsekkel termeltük, amelyek delta-7-sertés szomatotropint állítanak elő. A zárványtesteket izoláltuk a delta-7-pST-t termelő (PL-mu-delta-7-

pST) első plazmával és a hőmérséklet-érzékeny lambda-fág represszor fehérjét kódoló (pc1857) második plazmával transzformált E. coli HB101 törzsből. Számos más mikroorganizmus is termel olyan zárványtestet, amely más rekombináns fehérjét tartalmazhat, ezek a találmány szerinti eljárással feldolgozhatók. Az ilyen mikroorganizmusok hasonló tenyésztési módszere jól ismert a szakterületen.

1. példa

Rekombináns sertés szomatotropint (rpST) nyerünk ki mikroorganizmus zárványtestekből úgy, hogy (1) a zárványtesteket nátrium-dodecil-szulfátban (SDS) oldottuk, (2) az oldatból az oldhatatlan szennyezőanyagokat eltávolítottuk, és (3) az oldatból az SDS-t eltávolítottuk, hogy az rpST újrarahajtogatódjon bioaktív konfigurációjába. A kapott fehérjeoldat tartalmazta az rpST-t, nagy molekulatömegű fehérje szennyezőanyagokat, kis molekulatömegű fehérje szennyezőanyagokat, kis molekulatömegű szennyező fehérjéket és más nem-fehérje szennyezőanyagokat. Ezt az oldatot membránválasztási módszerrel tisztítottuk. A membránválasztás néhány nagy molekulatömegű szennyezőanyagot eltávolított, de jelentős mennyiségű nagy molekulatömegű szennyeződés maradt jelen, ami miatt további tisztításra volt szükség.

Az rpST-t, nagy molekulatömegű szennyezőanyagokat, kis molekulatömegű szennyező fehérjéket és más nem-fehérje szennyezőanyagokat tartalmazó 20 ml-es fehérjeoldat mintákat 50 ml-es szélesszájú poharakba mértük, és jégfürdőbe helyezve hőmérsékletüket 5 és 10 °C közötti hőmérsékleten tartottuk. Előre meghatározott mennyiségű 0,5–1,0 térfogat%-os amin-reagens-oldatot (dodecil-amin-hidroklorid és kereskedelembe kapható A-1 és A-36A amin-vegyületek (lásd 1. táblázatot) adtunk a mintákhoz 1 vagy 3 ml-es fecskendővel. A poharak tartalmát egy teflon rúddal kb. 1–3 percig óvatosan kevertük. Szinte azonnal csapadék képződött. Lassabb (cseppenként történő) adagolással kevesebb terméket kaptunk (kisebb P/M arány). Magasabb hőmérséklet (25 °C) szintén nagyobb kitermelést eredményezett. (A magasabb hőmérsékleten végzett eljárás azonban nem biztos, hogy megvalósítható a mikroorganizmusok növekedése miatt). A poharak tartalmát centrifugáltuk, és a felülúszót 0,2 µm-es szűrőn átszűrtük, így készítettük elő a mintát gélpermeációs kromatográfiához (GPC).

A centrifugált felülúszóból egy éjszakán át tartó tárolás hatására nem vált ki csapadék, ami arra utal, hogy a reakció teljes volt. A felülúszót GPC útján elemeztük, és a kapott eredmények alapján számoltuk a rpST kitermelést és a polimer/monomer (P/M) arányt a felülúszóban.

Az eredmények azt mutattak, hogy kb. 0,05 térfogat% amin-reagens koncentrációval kb. 90%-os rpST kitermelést értünk el, majdnem zero P/M arány mellett. A kereskedelembe kapható, P-14B és 52-267 jelű amin-vegyületekkel (lásd 1. táblázatot) szintén végeztünk kísérleteket, azonban a dodecil-amin-hidroklorid és az A-1 jelű reagens mellett döntöttünk, mivel rész-

ben alacsonyabb kitermelést, magasabb P/M arányt adtak volna, másrészt nagyobb mennyiségű reagensre lett volna szükség. A vizsgált vegyületeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

2. példa

Az 1. példában említett A-1 amin-vegyületet és dodecil-amin-hidrokloridot, valamint különböző további amin-vegyületet, például trimetil-dodecil-, hexadecil- és oktadecil-ammónium-kloridot, DUOMAC-T-t (N-faggyúalkil-1,3-diaminopropán-diacetát), ARQUAD-2C-75-t (dimetil-dikókuszkil-ammónium-klorid) és hexil-amint különböző koncentrációknál félüzemi mennyiségekben vizsgáltunk, és membrán-tisztításnak nem vetettük alá. A hexil-amin kivételével a fenti reagensekkel ki tudtuk csapni a fehérjét. A szelektivitás és a pST kitermelés azonban változó volt.

A dodecil-, hexadecil- és oktadecil-ammónium-klorid esetén a pST polimer szelektív kicsapásához szükséges reagens-koncentráció a szénlánc hosszától függött, amennyiben a 18 szénatomos oktadecil-származékból 0,02 térfogat% volt szükséges, míg a 16 szénatomos hexadecil-származékból 0,03 térfogat%, a 12 szénatomos dodecil-származékból pedig 0,04–0,06 térfogat%. Azonos P/M aránynál a pST kitermelés a trimetil-dodecil-ammónium-klorid (TDAC) esetén volt a legnagyobb.

A vizsgált amin-vegyületek közül szelektivitás és kitermelés szempontjából a 0,08 és 0,12 térfogat% közötti DUOMAC-T volt a legmegfelelőbb.

A 2. táblázatban összefoglaltuk a DUOMAC-T-vel és TDAC-vel különböző rekombináns fehérje adagokon végzett kicsapási vizsgálatok eredményeit. A kitermelés (75–82%) jobb, mint a membrán-tisztítás esetén. Emellett a találmány szerinti kicsapási eljárás egyszerűbb és bajmentesebb. Mivel a termékek rendszerint igen értékesek a kitermelésben bekövetkezett kis javulás is jelentős gazdasági hasznot jelent.

A DUOMAC-T koncentrációjának a pST kitermelésre és a P/M arányra gyakorolt hatását részletesen megvizsgáltuk néhány további nyers rekombináns fehérje mintán. Az 1. ábrán bemutatott néhány tipikus eredmény azt mutatja, hogy a pST kitermelés és a P/M arány között összefüggés van, azaz magasabb kitermelés magasabb P/M aránnyal jár együtt. Mivel a kívánt P/M arány az előtisztított termék esetén mintegy 0,5 vagy ennél kevesebb, a DUOMAC-T-koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy ezt a kívánalmat a lehető legmagasabb kitermelés mellett érjük el.

A DUOMAC-T-vel végzett kicsapás után kapott pST felülúszót szövetmegkötési vizsgálattal, izoelektromos fókuszálással (IEF) és nagynyomású folyadék-kromatográfiával (HPLC) elemeztük. A szövetmegkötési vizsgálatban a pST 98%-os aktivitást mutatott a standard pST-mintához viszonyítva, ami arra utal, hogy a pST nem denaturálódott. Hasonlóképpen az IEF és HPLC vizsgálatok sem mutattak különbséget a DUOMAC-T-vel kezelt és a nem kezelt pST-minták között, ami arra utal, hogy a pST szerkezete nem változott.

1. táblázat

A pST polimer szelektív kicsapására alkalmazható reagensek felsorolása

Reagens	Forgalmazó
Hexil-amin	Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI
Dodecil-amin-hidroklorid	Eastman Kodak, Rochester, NY
Trimetil-oktadecil-ammónium-klorid	ARMAC Chemicals, McCook, IL
Trimetil-hexadecil-ammónium-klorid	Eastman Kodak, Rochester, NY
Trimetil-dodecil-ammónium-klorid (TDAC)	ARMAC Chemicals, McCook, IL
Dimetil-dikókuszkil-alkil-ammónium-klorid (ARQUAD-2C-75)	ARMAC Chemicals, McCook, IL
Dimetil-diammónium-klorid	ARMAC Chemicals, McCook, IL
N-Faggyú-alkil-1,3-diaminopropán-diacetát (DUOMAC-T)	ARMAC Chemicals, McCook, IL
A-1 amin, P-14B, A-36A, 52-267*	Sherex Polymer, Inc., Lakeland, FL

* kereskedelmi termékek:

A-1: Primer aminok acetátsója. Szekunder és terciér aminok szennyezés formájában jelen lehetnek.

P-14B: $C_{10}H_{21}-O-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$: éteramin-acetát.

A-36A: Zsír-sav-amid-aminok acetátsója.

52-267: Az A-36A amin 5%-os vizes diszperziója.

2. táblázat

Különböző félüzemi termelésből származó előtisztított sertés szomatotropin minták amin-kezelésével kapott kitermelések és P/M arányok

Betáplálás	Kitermelés (tömeg%)	P/M arány
263-6 jelű minta (538 ppm, 2,3 P/M) Dodecil-amin-hidroklorid (0,06%)	77	0,7
DUOMAC -T (0,1%)	86	0,15
264-6 jelű minta (672 ppm, 2,1 P/M) TDAC (0,05%)	62	–
DUOMAC -T (0,1%)	76	0,5*
265-6 jelű minta (660 ppm, 2,5 P/M) TDAC (0,03%)	77	0,2
DUOMAC -T (0,075%)	83	0,3–0,5
DUOMAC -T (0,1%)	79	0,1–0,3
266-6 jelű minta (610 ppm, 3,6 P/M) TDAC (0,03%)	75	0,6
DUOMAC -T (0,1%)	85	0,6
270-6 jelű minta (606 ppm, 3,9 P/M) TDAC (0,05%)	85	0,67
DUOMAC -T (0,09%)	89	0,35

Betáplálás	Kitermelés (tömeg%)	P/M arány
DUOMAC -T (0,11%)	73	0,05
271-6 jelű minta (369 ppm, 3,9 P/M) DUOMAC-T (0,06%)	82	0,3
273-6 jelű minta (369 ppm, 4,0 P/M) DUOMAC-T (0,075%)	76	0,4
279-6 jelű minta (416 ppm, 3,2 P/M) DUOMAC-T (0,05%)	88	0,6
280-6 jelű minta (295 ppm, 4,2 P/M) DUOMAC-T (0,06%)	82	0,5
268-OOE jelű minta (682 ppm, 6,1 P/M) DUO- MAC-T (0,15%)	85	0,3
Átlag:		
TDAC	75	0,4
DUOMAC-T	82	0,4

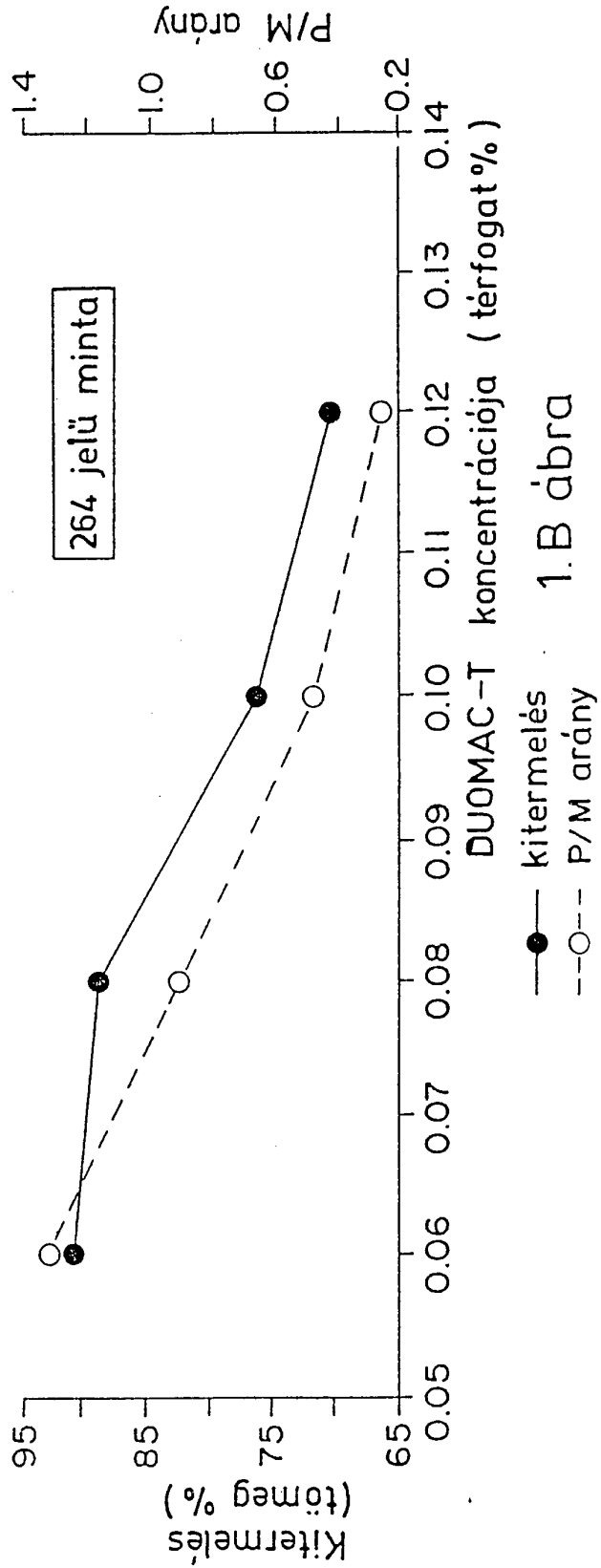
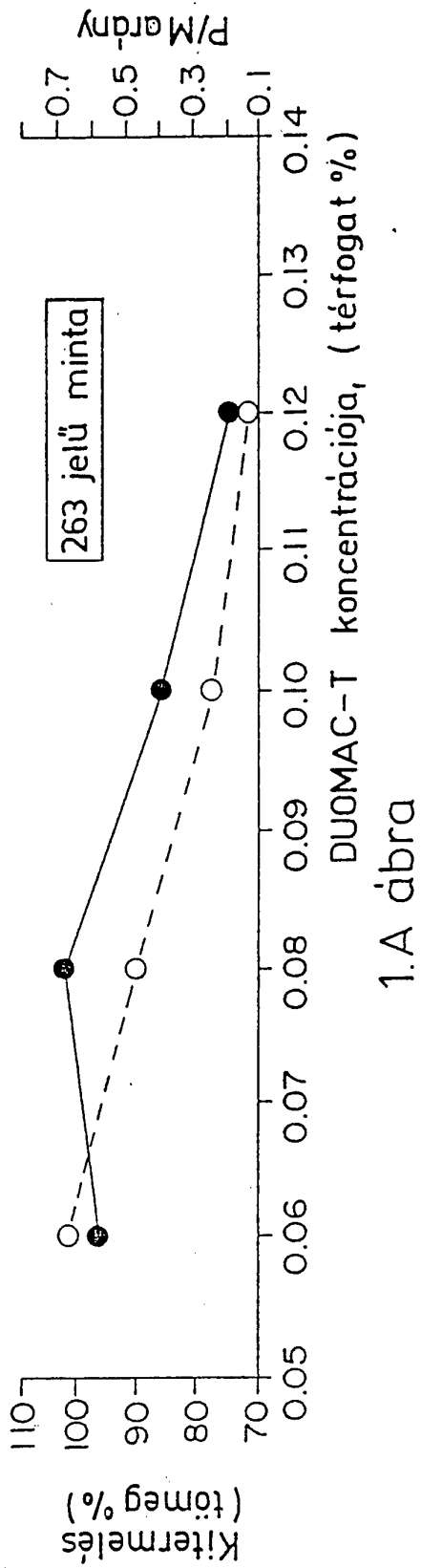
* Feltételezhetően interferencia az előző minta nyomával.

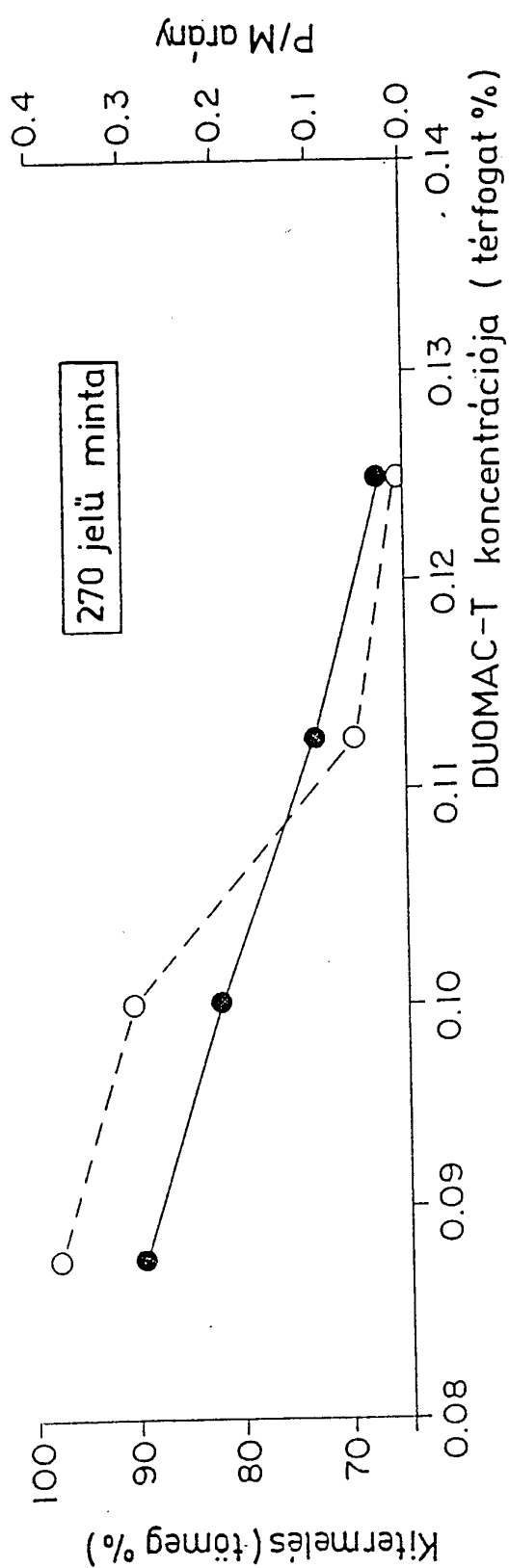
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás rekombináns fehérje kinyerésére olyan fehérjeoldatból, amely a kívánt rekombináns fehérjét és annak molekulatömegénél legalább 1,5-ször nagyobb molekulatömegű szennyező fehérjéket tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy közvetlenül a fehérjeoldathoz a szennyező nagy molekulatömegű fehérje szelektív kicsapásához szükséges mennyiségben, célszerűen 0,01–2 térf% végső koncentrációig egy, 1–4 alkilhelyettesítőt tartalmazó amint vagy kvaterner ammóniumvegyületet adunk, ahol az alkilhelyettesítők közül legalább az egyik 10–20 szénatomos, míg a többi 1–6 szénatomos, majd a csapadékot elválasztjuk az oldattól, és a kívánt fehérjét kinyerjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminként vagy kvaterner ammónium-vegyületként N-faggyúalkil-1,3-diamino-propán-diacetátot vagy trimetil-dodecil-ammónium-kloridot alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns fehérjeként sertés vagy szarvasmarha rekombináns szomatotropint tartalmazó oldatot alkalmazunk.





1.C ábra

