



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **92-0932**

(22) Data de depozit: **08.01.1990**

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.11.1997 BOPI nr. **11/1997**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 90 / 00141 08.01.1990**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 91/10730 25.07.1991**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
Biochem J 173, 723...737;
Eur.J.Biochem, vol.12411, 1982,
183...190

(71) Solicitant: **NIKA HEALTH PRODUCTS LTD., VADUZ, LI; NIKA HEALTH PRODUCTS, INC., PRINCETON, US;**

(73) Titular: **NIKA HEALTH PRODUCTS LTD., VADUZ, LI;**

(72) Inventatori: **HERRMANN PETER, 4452 ITINGEN, CH; KLEIN PETER, 4452 ITINGEN, CH;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI**

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A UNUI PRODUS DIMERIC DE RIBONUCLEAZĂ**

(57) **Rezumat:** Procedeul de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează constă în aceea că reacția de dimerizare din faza (c) este oprită prin scăderea pH-ului la valoarea de aproximativ 7, prin adăugarea de acid, după care amestecul rezultat este concentrat și supus purificării, în conformitate cu faza (d), care cuprinde cel puțin două faze ulterioare de cromatografie lichidă, unde, după prima fază de cromatografie lichidă, fracțiunile, care conțin în special forma dimerică a ribonucleazei, sunt colectate și concentrate și, după aceea, supuse unei a doua faze de cromatografie lichidă.

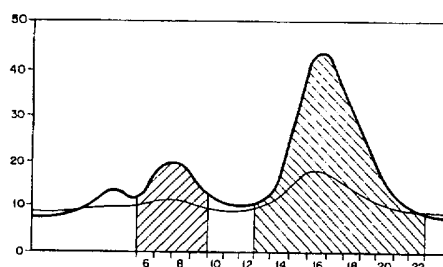


Fig. 1

Revendicări: 17
Figuri: 2

RO 112641 B1



Prezenta invenție se referă la un procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, care se utilizează la tratarea infecțiilor virale și bacteriene.

Numărul tot mai mare de tulpini bacteriene și de boli virale ce prezintă rezistență față de antibioticele cunoscute duc la necesitatea de a introduce noi tipuri de medicamente în scopul tratării oamenilor și animalelor. Printre multiplele tratamente prezente, utilizate la ora actuală în medicină, se cunoaște și administrarea de enzime în forma de monomer, pacienților afectați de diferite afecțiuni. În unele cazuri, acest lucru este necesar, deoarece anumite condiții ale bolii produc o reducere a activității anumitor enzime. Enzimele sunt proteine catalitice active, ce efectuează aproape întreaga majoritate a proceselor vitale din organism. Astfel, multe enzime, fie individual, fie în combinații, au fost izolate datorită efectelor lor fiziologice, fiziologice sau biologice.

Printre diferitele enzime care sunt cunoscute ca având efecte terapeutice sau care suferă o reducere a activității în anumite condiții ale bolii, sunt ribonucleazele. Ribonucleazele constituie un grup de enzime nucleice prezente în mod obișnuit la multe animale și plante.

Studiul proprietăților ribonucleazei și metodele de izolare a acestei enzime au fost inițiate la mijlocul anilor 1950 de către Schmidt și McDonald. Printre multe descoperiri bazate pe enzimă, s-a descoperit și faptul că țesutul canceros prezintă o foarte redusă activitate a ribonucleazelor sale. Într-un caz, s-a descoperit că șoarecele ce prezintă leucemie are o considerabilă scădere a activității ribonucleazei ce s-a observat în mod particular în formațiunile mitocondriale și microsomiale obținute din fracțiuni de țesut de splină a acestor animale. Studii de acest gen au indicat că administrarea de ribonuclează ar putea fi utilizată pentru prevenirea sau combaterea simptomelor asociate leucemiei virale.

Din nefericire, efectele benefice potențiale ce ar putea fi atinse prin utilizarea ribonucleazei nu s-au materializat în primul rând datorită efectului puternic

citotoxic al formei monomer a enzimei. De exemplu, în teste cu fibroblaste cultivate, s-a observat efect citotoxic rezultat de la doze de ribonuclează în forma de monomer chiar la administrare de doze extrem de scăzute. Evident, s-a impus necesitatea de a dezvolta căi de a aduce la maximum efectele benefice potențiale ale ribonucleazei în timp ce se aduc la minimum efectele citotoxice dăunătoare potențiale asociate cu forma monomerică a enzimei.

De curând, s-a descoperit că o compoziție antivirală sau antibacteriană poate fi construită din ribonuclează ce nu prezintă efecte citotoxice când se prepară o compoziție bazată pe forma dimerică a enzimei. Utilizarea unei compoziții cu dimer de ribonuclează s-a dovedit a fi efectiv eficientă în tratamentul a numeroase afecțiuni infecțioase, și în același timp, nu produce efectele citotoxice ridicate normal asociate ribonucleazei în forma de monomer.

Carlsson și colaboratorii [Carlson et al., *Biochem. J.* 173, 723...737, 1978] analizează prepararea de conjugați proteină-proteină, folosind N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionat. Ei prezintă legarea - într-o primă fază - ribonucleazei de un agent de reticulare și după aceea - într-o a doua fază - legarea derivatului de ribonuclează cu o soluție de mercaptalbumin la $pH=7,5$. După un timp de reacție de 40 de min, amestecul este supus unei filtrări pe gel, asupra Sepharose 6B.

Sorrentino și colaboratorii [Sorrentino et al., *Eur. J. Biochem.*, vol. 124/1, 1982, 183...190] prezintă o metodă de dimerizare a deoxiribonucleazei de pancreas de bovină cu dimetilsubeimidat ca agent de reticulare, la un $pH=8,5$, unde reacția de dimerizare se termină prin adăugare de acetat de amoniu, după care produsele de reacție care rezultă sunt supuse cu filtrări pe gel într-o singură fază cu Sephadex G-100 superfin, care produce 10% din dimerii de deoxiribonuclează.

În timp ce metoda lui Carlsson și colaboratorii nu dă posibilitatea să se prepare ribonuclează dimerizată și nici să se separe monomerii ai ribonucleazei, neîntra

te în reacție, din amestecul de reacție, metoda lui Sorrentino și colaboratorii cuprinde - ca un dezavantaj major - adăugarea de acetat de amoniu pentru oprirea dimerizării. Prin adăugare de acetat de amoniu la agentul de reticulare neintrat în reacție al amestecului, moleculele sunt blocate prin reacție cu ioni de amoniu, unde se evită reciclarea fracțiunii de monomer nedimerizat. De asemenea, purificarea prin filtrare pe gel, după cum arată Carlsson și colaboratorii și Sorrentino și colaboratorii, nu este convenabilă pentru o separare suficientă de molecule mai mici adică a monomerilor de ribonuclează din dimeri mai mari și agregate oligomerice.

Aceste dezavantaje existente în stadiul cunoscut al tehnicii sunt depășite de procedeul de preparare conform invenției.

Cu toate că anumite căi de preparare a formei dimer a ribonucleazei din formele sale monomer sunt cunoscute, este important ca să existe posibilitatea de a se obține cantități mari de formă dimer la prețuri de cost scăzute și în manieră eficientă. Este deci foarte de dorit să se dezvolte un sistem pentru producerea și testarea unor cantități mari de dimer ribonuclează purificat care are minimum de impurități ca monomeri, multimeri, sau alți contaminanți.

Procedeul de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform invenției, constă în aceea că, reacția de dimerizare este oprită prin scăderea pH -ului la valoarea de aproximativ 7 prin adăugarea de acid, după care amestecul rezultat este concentrat și supus purificării care cuprinde cel puțin două faze ulterioare de cromatografie lichidă, unde după prima fază de cromatografie lichidă, fracțiunile care conțin în special forma dimerică a ribonucleazei sunt colectate și concentrate și apoi supuse la o a doua fază de cromatografie lichidă. Soluția de ribonuclează monomerică se reglează la un pH de circa 10, preferabil prin adăugare de NaOH. Soluția tampon din faza A cuprinde disodiu hidrogen fosfat dihidrat. Reactivul de cuplare se adaugă în soluția de ribonuclează monomerică în timp ce soluția

este menținută la un pH de aproximativ 10. Reactivul de cuplare suberimidat cuprinde dimetil suberimidat. Faza (b) de dimerizare se efectuează la temperatura camerei, preferabil în timp ce soluția este continuu agitată. Reacția de dimerizare se oprește prin adăugare de HCl. Soluția de ribonuclează dimerizată este concentrată înainte și/sau după prima fază de cromatografie lichidă, folosind un sistem de curgere tangențială. Cel puțin o fază de cromatografie lichidă se efectuează folosind o matrice reticulată cu dextran cu un domeniu preferat de fracționare pentru peptide și proteine globulare cu greutatea moleculară de 1500 până la 30000. Se adaugă o parte din reactivul de culoare la o soluție de monomer de ribonuclează constituit din 10 părți de monomer de ribonuclează la 100 părți soluție tampon, părțile fiind în greutate. Fracțiunile colectate după prima fază de cromatografie lichidă sunt liofilizate. Fracțiunile colectate după prima fază de filtrare care conțin, în principal, ribonuclează monomerică sunt reciclate în faza (b) de dimerizare. Cel puțin o fază de cromatografie lichidă se efectuează folosind o rășină convenabilă, schimbătoare de ioni. A doua fază de cromatografie lichidă se efectuează la un pH de circa 5, pH -ul fiind, preferabil, reglat cu un tampon de acetat de sodiu. Fracțiunile colectate în timpul primei și/sau celei de-a doua faze de cromatografie lichidă sunt analizate prin gel-electroforeză. Se efectuează după a doua fază de cromatografie lichidă, cel mai bine cu ajutorul unei matrice reticulată cu dextran, cu un domeniu de fracționare pentru peptide și proteine globulare, cu greutatea moleculară de 1000 până la 5000. O fază de îndepărtare a endotoxinelor din soluția de dimer de ribonuclează, purificată, preferabil cu ajutorul cromatografiei pe gel folosind o matrice de cromatografie pe gel pentru detoxifiere, convenabilă.

La prepararea formei dimer a ribonucleazei, conform prezentei invenții, orice formă disponibilă de monomeri ribonuclează se poate utiliza ca materie primă de pornire. Monomerii utilizați pot

cuprinde Ribonucleaza A, sau orice alte varietăți de ribonucleaze disponibile. Monomerii ribonucleazei sunt preparați pentru reacția de cuplare prin dizolvarea monomerilor ribonucleazei în tampon fosfat la temperatura camerei, în scopul de a prepara o soluție de monomer ribonuclează. Tamponul utilizat este preferabil soluție 0,1 M disodiu hidrogen fosfat dihidrat, și monomerul este dizolvat prin agitarea continuă a soluției timp de cel puțin două ore. O soluție tampon corespunzătoare s-a preparat prin dizolvarea a aproximativ 70 g de disodiu hidrogen fosfat dihidrat în aproximativ 1000 ml apă. Cu toate că, cantitățile actuale de reactivi și soluții utilizate în prezenta invenție pot varia, reacția de dimerizare, conform prezentei invenții, poate fi efectuată utilizând de la 40 la aproximativ 60 g de monomer ribonuclează dizolvat într-un pahar conținând aproximativ 5 l de tampon disodiu hidrogen fosfat dihidrat. Este preferabil de asemenea ca soluția monomer să aibă pH-ul ajustat la cel puțin aproximativ 9, și cel mai preferabil aproximativ 10. Ajustarea pH-ului poate fi făcută utilizând soluție 0,1 N hidroxid de sodiu.

Reacția de dimerizare este lăsată să aibă loc prin adăugarea reactivului de cuplare-suberimidat în proporție față de soluția monomer de ribonuclează în timp ce se menține pH-ul la sau aproximativ cel puțin aproximativ 9, și preferabil 10 (+ sau - 0,2).

Este preferabil ca în prezenta invenție să se utilizeze agentul de cuplare dimetil suberimidat, dar se pot utiliza și alți agenți de cuplare suberimidat cunoscuți. La soluția preparată conform descrierii de mai sus, se adaugă preferabil 4...6 g de dimetil suberimidat în soluția monomerică, și reactivul de cuplare se dizolvă în aproximativ un minut. Cu agitarea continuă, cu ajutorul unui agitator magnetic sau altui dispozitiv de agitare, reacția de dimerizare se lasă să aibă loc timp de aproximativ 30...60 min la temperatura camerei, aproximativ 25°C (+ sau minus 5°C). Reacția poate fi întreruptă prin scăderea pH-ului la 7,0 (plus sau minus

0,2), și acest lucru poate fi făcut prin adăugarea de soluție de acid clorhidric 1M. La acest punct, este preferabil ca amestecul rezultat să fie concentrat, utilizând sistemul de curgere tangențial, așa cum se va descrie mai detaliat în cele ce urmează.

La diferite puncte, la timpul ce urmează după începerea reacției de cuplare, este util să se îndepărteze probe din soluție și să se supună analizei prin gel-electroforeză. Studiile de gel-electroforeză au arătat că deși forma monomerică a enzimei a fost clar vizibilă în aproape majoritatea fracțiunilor analizate, o bandă corespunzătoare formei dimerice a ribonucleazei este detectabilă după aproximativ 10 min de la pornirea reacției. Banda corespunzătoare formei dimerice a enzimei poate fi văzută cu claritate după aproximativ 15 min, și această bandă devine mai pronunțată cu progresarea timpului de reacție. Formele oligomere ale enzimei pot fi observate de asemenea după aproximativ 30 min după adăugarea agentului de cuplare. Forma monomerică a ribonucleazei are o greutate moleculară relativă de 15.000, și forma dimerică va fi dublă față de aceasta.

În scopul de a prepara cantități mari de produs, care este în primul rând dimer purificat de ribonuclează, este preferabil ca soluția de ribonuclează dimerizată să treacă prin cel puțin două etape de filtrare în scopul de a izola dimerii ribonucleazei și îndepărtarea formelor de ribonuclează monomer sau multimer. Monomerii ribonucleazei nedimerizate îndepărtați pot fi colectați și preferabil recirculați, conform procedurii prezentei invenții, astfel ca în continuare să se maximizeze eficiența producerii formei dimere a enzimei. În scopul separării oligomerilor din soluția de ribonuclează dimerizată, este preferat ca soluția să se filtreze prin rășină schimbătoare de ioni. Într-o formă preferată, filtrarea este efectuată, prin utilizarea unei coloane preparate cu material schimbător de ioni tip Sephadex. Coloana cu Sephadex, de aproximativ 25 cm diametru și aproximativ 120 cm înălțime se prepară și se clătește cu un volum de aproximativ

60 l de soluție 50 molară amoniu hidrogen carbonat la un pH de aproximativ 8,6. Acest tampon carbonat se prepară prin dizolvarea a aproximativ 4 g de amoniu hidrogen carbonat în 1.000 ml de apă. Intreaga soluție de ribonuclează obținută mai sus este apoi aplicată pe coloană și eluată cu tampon la echilibru. Fracțiunile de soluție sunt colectate prin colector de fracții, astfel cum ar fi un LKB 2211 Suprec, și viteza de curgere a soluției este aproximativ grosier 80 ml/min. Profilul de eluare este înregistrat prin dispozitive de înregistrare, cum ar fi înregistratorul LKB 2210, măsurându-se viteza de 0,5 mm/min, și absorbția poate fi măsurată la 280 nm cu LKB 2238 UNICOR SII. Profilele de eluare obținute din această etapă de filtrare vor fi în general cu trei picuri; primul pic reprezintă multimerii ribonucleazei, al doilea pic reprezintă dimerii, și ultimul pic reprezintă cantitatea rămasă de monomer de enzimă. În acest punct, este de asemenea bine să se analizeze fracțiunile colectate individual, utilizând analiza gel-electroforeză. O astfel de analiză poate fi efectuată cu procedeul SDS-poliacrilamid gel-electroforeză (sau SDS-PAGE) descris de Thomas și colaboratori *PNAS* 72:2626 (1975). În acest studiu electroforetic, preferabil aproximativ 50 microlitri de fracțiune colectată se amestecă cu aproximativ 50 microlitri de tampon de acoperire și se încălzește o perioadă de aproximativ 10 min la aproximativ 95°C. Apoi, aproximativ 25 microlitri din acest amestec se răspândesc pe un suport de gel (fracțiune de gel). În final, electroforeza este efectuată timp de aproximativ 4 h, la 20...35 mA în scopul de a separa diferitele forme de enzime ribonuclează. Benzile proteinei sunt făcute vizibile prin colorarea cu colorant cum ar fi Coomassoe-Blue 250.

Utilizând procedeul SDS-PAGE electroforeză, fracțiunile conținând formele monomer, dimer, sau oligomer ale ribonucleazei, sau amestecuri ale acestora, pot fi identificate și sortate. După identificarea compoziției fracțiunilor, acele fracțiuni care sunt cel mai apropiat de

forma dimerică sunt izolate. Fracțiunile dimer sunt preferabil concentrate în continuare până la aproximativ 80 ml în sistemul de curgere tangențial. Diagrama membrană a sistemului tangențial de curgere poate fi din nou clătită cu un solvent corespunzător astfel ca să se rețină o cantitate mai mare de dimer. Această soluție este preferabil liofilizată și poate fi stocată la temperaturi de aproximativ 4°C până ce au loc alte etape de prelucrare. Ideal, liofilizarea este efectuată prin distribuirea porțiunii de aproximativ 200 ml de soluție în baloane rotunde de 500 ml și introduse în atmosferă de azot și apoi în evaporator rotativ. Baloanele sunt etanșate și stocate timp de 30 min la - 30°C, după care materialul este liofilizat. Deoarece materiile prime de placare sunt adesea scumpe, este preferabil în mod particular ca monomerii filtrați în etapa anterioară de filtrare să fie returnați la procesul de dimerizare, conform prezentei invenții. Aceasta se poate efectua prin colectarea fracțiunilor identificate ca, conținând o cantitate substanțială de monomer ribonuclează, concentrarea lor utilizând un sistem de curgere tangențial, și adăugarea agentului de cuplare identificat mai sus, reacția de cuplare apare așa cum s-a arătat mai sus, și apoi se efectuează etapa de filtrare descrisă mai sus. După liofilizarea ribonucleazei recirculate, noii dimeri formați sunt complet amestecați cu produsul dimerizat obținut din primul ciclu de dimerizare. Creșterile în randamentul produsului dimer de până la 30% pot fi obținute prin mijloacele acestor tehnici de recirculare.

Soluțiile dimeri primari obținute mai sus sunt purificate în continuare prin efectuarea unei a doua etape de filtrare în scopul de a separa în continuare dimerii de monomeri și oligomeri și de a crește puritatea produsului final. În acest caz, este preferabil ca amestecul enzimatic liofilizat obținut mai sus să fie complet eluat prin rășină schimbătoare de ioni cum ar fi o coloană cu Sephadex G 50 F. De asemenea, este preferabil ca în această etapă coloana cu rășină schimbătoare de

ioni să aibă pH -ul ajustat la aproximativ 5, și acest lucru poate fi atins prin utilizarea soluției tampon de acetat de sodiu 0,2 molar. Tamponul acetat de sodiu de pH 5 se prepară prin utilizarea a 27 g de acetat de sodiu trihidrat dizolvat în 1.000 ml de apă. Frațiunile colectate corespund celui de-al doilea pic, așa cum s-a determinat prin măsurătorile din prima etapă de filtrare, ce se aplică coloanei cu Sephadex. Condițiile și materialele descrise în prima etapă de filtrare sunt preferabil utilizate din nou când fracțiunile sunt supuse celei de-a doua etape de filtrare. Din nou, un profil de eluare este înregistrat și utilizat la identificarea și izolarea fracțiunilor dorite colectate după a doua etapă de filtrare. În acest caz, profilul de eluare arată un pic principal corespunzător unei mari cantități de dimer și numai două picuri secundare ascuțite. Din nou este preferabil ca analiza SDS-PAGE a enzimelor ribonuclează prelevată din fracțiunile colectate să fie efectuată după cum se indică mai sus. Aceste studii indică că, fracțiunile corespunzătoare picului principal a profilului de eluție conțin produs dimer al ribonucleazei puternic purificat. La acest punct, fracțiunile picului principal sunt colectate și preferabil sunt concentrate cu ajutorul sistemului de curgere tangențial. De asemenea, este preferabil la acest punct ca procesul de desalinizare să fie efectuat prin trecerea fracțiunilor peste o coloană cu Sephadex G 25. O coloană de aproximativ 25 cm ca diametru și 65 cm ca înălțime cu un volum de bază de 32 l este operată cu viteze de curgere de 15 l/h în scopul efectuării procesului de desalinizare. Suplimentar, se utilizează un tampon de 50 mmoli de amoniu hidrogen carbonat.

La acest punct, produsul constă din compoziție dimer de ribonuclează puternic purificată. Totuși, în scopul de a face liofilizarea dimerului ribonucleazei în forma farmaceutică utilă, este recomandat, ca dimerii să treacă printr-un procedeu în care endotoxinele pot fi îndepărtate. Astfel este preferat ca produsul dimer obținut mai sus să fie în continuare eluat cromatografic cu detoxigel

care are o ridicată capacitate de legare a endotoxinelor. Detoxigelul are o capacitate de legare a endotoxinelor de aproximativ 2 mg/ml. Deoarece legări nespecifice cu alți componenți cum ar fi dimerii proteinei, nu este posibil, cererea maximă de material dimeric poate fi obținută prin utilizarea tamponelor în domeniul de pH fiziologic. Adăugarea soluției saline de 0,1...0,5 M (de exemplu, clorură de sodiu) asigură domeniul de pH necesar în scopul obținerii unui randament maxim de dimer. Caracteristic, o soluție conținând 1.500 E.U./ml când este cromatografiată pe o coloană de detoxifiere poate fi redusă la mai puțin de 1,0 E.U. ml.

După răcirea (înghețarea) soluției dimer ribonuclează de endotoxine, soluția este colectată, steril-filtrată, și trecută la liofilizare în balon cu fund rotund steril. Conținutul de endotoxină final din preparat poate fi determinat cu o trusă de diagnosticare cum ar fi trusa "Coatest (R)". Acest test este bazat pe activarea lui *Limulus-amoebacyten-lysate* (LAL) cu endotoxine. LAL-ul activat separă colorantul galben *p*-nitroanilină din substratul cromogenic (S-2423), a cărui extincție este măsurată ca determinant al conținutului de endotoxină, la 405 nm utilizând un fotometru spectral. Dacă conținutul de endotoxină este sub 0,1 ng/mg, atunci soluția de dimer este introdusă într-un balon cu fund rotund și liofilizată.

Procedeu de mai sus poate fi repetat atât de des, cât este posibil, până ce cantitatea dorită de produs dimer de ribonuclează se obține. Șarjele individuale de produs dimer, după purificare, pot fi sterilizate sau liofilizate în continuare dacă se impune, și se obțin șarje omogene de dimer ribonuclează care pot fi puternic utile la tratamentul multor afecțiuni virale și bacteriene. Suplimentar efectelor antibacteriene și antivirale, alte beneficii terapeutice ale dimerilor ribonucleazei, cum ar fi utilizarea ca agent anti-inflamator sau agent antihistaminic, pot fi obținute fără a avea asociate efectele citotoxice asociate formei monomer a enzimei. Prezentul procedeu este util în mod particular prin

aceea că, cantități mari de produs dimer ribonuclează purificat pot fi obținute în mod eficient. Producții particulare dimeri ai ribonucleazei obținuți prin utilizarea procedurii conform prezentei invenții pot fi testați pentru stabilirea activității enzimice a lor pe soluții de acid ribonucleic și controlați utilizând un fotometru spectral după ce dimerul ribonucleazei este aplicat. Utilizarea prezentului procedeu permite astfel prepararea enzimei dimerice puternic purificată și testarea activității sale la fel de bine.

În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a prezentei invenții.

Exemplul 1. Prepararea dimerului ribonucleazei. 50 g de monomer ribonuclează se dizolvă într-un pahar acoperit conținând 5 l de soluție 0,1 M disodiu hidrogen fosfat dihidrat și se ajustează pH-ul la valoarea 10,0 cu soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N. Tamponul disodiu hidrogen fosfat dihidrat se prepară prin dizolvarea a 70,98 g disodiu hidrogen fosfat dihidrat în 1,000 l de apă. Apoi se adaugă 5 g de agent de cuplare dimetil suberimidat la temperatura camerei (25°C) și dimetil suberimidatul se dizolvă într-un minut. Se controlează nivelul pH-ului soluției și se ajustează continuu pentru a se menține la 10, utilizând soluție 0,1 N de hidroxid de sodiu. Utilizând un agitator magnetic, soluția se agită continuu și se lasă să reacționeze 45 min la temperatura de aproximativ 25°C. Reacția se oprește la scăderea pH-ului la valoarea 7, utilizând soluție de acid clorhidric 1 molar. La diferite puncte de la pornirea reacției de cuplare, se recoltează probe și se analizează prin gel-electroforeză. Monomerii, dimerii și multimerii ribonucleazei se separă prin SDS gel. Forma monomerică a ribonucleazei utilizate are o greutate moleculară relativă de 15.000, și forma dimerică are greutatea moleculară dublă. Studiile electroforetice arată că banda corespunzătoare dimerului se poate vedea după 15 min de la adăugarea agentului de cuplare, și această bandă devine mai pronunțată pe măsură ce reacția progresa. Suplimentar, formele oligomerice ale ribonucleazei se obțin după 30 min.

Soluția de ribonuclează dimerizată se concentrează la 800 ml în sistem de curgere tangențial (sistem Millipore). Sistemul Millipore include un filtru Filtron Ausschluss 10.000 d, o membrană olefinică de rezistență la picătură de 7 bari, și o pompă Verder 80 W tip 20 - 30 # 60079. Presiunea de intrare este de 2 bari și presiunea de ieșire a fost la minim mai mică de 0,2. Capacitatea de lucru a fost de 1 l/h. Aparatul are un volum mort de 400 ml astfel că după terminarea procesului de concentrare, aparatul se clătește cu 400 ml ceea ce duce la obținerea unui volum final de 1.200 ml.

Soluția concentrată de ribonuclează este apoi supusă procesului de filtrare utilizând Sefadex G 50 F în scopul de a separa diferiții oligomeri formați pe parcursul procesului de dimerizare. Pentru această filtrare, se utilizează o coloană de diametru 25,2 cm și înălțimea de 120 cm ce se clătește cu 60 l de soluție 50 molară de amoniu hidrogen carbonat la pH 8,6. Soluția 50 molară amoniu hidrogen carbonat tampon se prepară prin dizolvarea a 3,95 g amoniu hidrogen carbonat în 1000 ml de apă. Apoi, întreaga soluție de proteină de 1.200 ml se înglobează în patul de gel și se eluează cu soluție tampon la echilibru. Se colectează fracțiuni de aproximativ 1.000 ml cu un colector de fracțiuni (LKB 2211 Suprec), timp de aproximativ 15 min, corespunzător unei curgeri de 80 ml/min. Profilul de eluare se înregistrează cu un înregistrator LKB 2210 la viteza de 0,5 mm/min și absorbția se măsoară la 280 nm cu fotometru LKB 2238 UVICOR SII. Profilul eluției se poate vedea în fig. 1 și prezintă trei picuri, primul din ele reprezentând multimerii ribonucleazei, cel de-al doilea prezentând formele dimerice, iar ultimul pic prezentând formele monomerice ale enzimei. În fig. 1, linia groasă indică profilul de absorbție al soluțiilor de ribonuclează cu detecție mai sensibilă decât în linia subțire cea mai scăzută (mai de jos) a graficului.

Amestecul de ribonuclează în fracțiunile individuale a fost apoi analizat prin SDS-poliacrilamid-gel-electroforeză,

procedeu (SDS-PAGE) în concordanță cu descrierea lui Thomas și colaboratorii, PNAS 72:2626(1975). În acest procedeu, 50 microl din fiecare fracțiune se amestecă cu 50 microl de tampon de acoperire și amestecul se încălzește timp de 10 min la 95°C. Apoi, 25 μ l din amestec se trece în locașul cu gel. Pe parcursul testării, amestecul standard lv de proteină este răspândit ca referință (ca martor), acoperindu-se greutatea moleculară 12.300; 30.000; 45.000; 66.200; și 76.000. Tamponul de acoperire utilizat a cuprins următorii ingrediente:

0,72 g tris HCl (0,06 m);
0,136 g EDTA (III) (5 mmol);
0,18 g glicerină (10%);
5 g SDS, pH fixat la 7,2 (se adaugă 90 ml apă);
10 ml *beta*-mercaptoetanol (10%).

Pentru procedeul de gel-electroforeză, se prepară un gel separator 18% care este acoperit cu un gel colector 3,9%. Soluția de gel separator de 18% acrilamidă cuprinde următorii ingrediente:

9 g acrilamidă,
0,045 g bisacrilamidă;
0,136 g tris HCl pH 8,8 (0,325 m);
0,03 g SDS;
200 μ l 10 % amoniu persulfat-soluție;
20 μ l TEMED.

Soluția gel colectare pentru 3,9% acrilamidă cuprinde următorii ingrediente:
0,39 g acrilamidă;
10,4 mg bisacrilamidă;
0,125 m tris HCl pH 6,8;
10 mg SDS;
100 μ l 10% amoniu persulfat soluție;
10 μ l TEMED.

SDS.poliacrilamida gel se prepară prin luarea a două plăci de sticlă de 20 x 20 cm complet curățate și clătite cu etanol, și introducerea între ele a două fâșii de spațiere de grosime 1 mm (lungime 20 cm, lățime 1 cm) ceea ce asigură spațiul dintre plăci în care se toarnă gelul. Fâșiile de spațiere se montează pe laturile stângă și dreaptă a plăcilor de sticlă. Partea de la bază se izolează cu o bandă

adezivă textilă, și toate celelalte margini sunt prinse pentru întărire, cu cleme. Marginile sunt izolate suplimentar cu soluție 1% de agaroză. După întărirea agarozei, soluția gel-separatorare preparată mai sus este introdusă în interstițiile respective în poziție verticală până la aproximativ 3 cm sub marginea de sus a plăcii de sticlă, și cu ajutorul unei pipete Pasteur, se introduce spre completare un strat de apă. Gelul se polimerizează după aproximativ 30 min. Apa de acoperire este eliminată, și marginile gelului sunt clătite o dată cu soluția de gel colectoare descrisă mai sus. După aceasta, se completează cu soluție gel colectoare până la marginea de sus a plăcuțelor, și un dispozitiv pieptene de colectare a probei, din teflon este pus peste marginea superioară, astfel ca lăcașurile ce rămân (buzunarele pentru probă) să fie la aproximativ 1 cm peste marginea de sus a stratului de gel separator. După aproximativ 15 min, gelul colector este polimerizat, și pieptenele poate fi îndepărtat. Apoi, se îndepărtează banda adezivă textilă și gelul este adus în poziție verticală la aparatul de electroforeză.

Camerele tampon sunt umplute cu tampon de electroforeză (6 g bază tris, (0,05 m); 28,5 g glicină, (0,38 m); 1 g SDS, (0,1 %); și 1.000 ml apă) și buzunarele de gel sunt clătite o dată cu ajutorul sprayului tampon. Probele de dimer de ribonuclează sunt încălzite aproximativ 10 min în tamponul de acoperire la 95°C și introduse într-un rezervor sau zonă din buzunarul de testare a probei corespunzător buzunarului cu gel.

Electroforeza se execută la aproximativ 20 mA timp de aproximativ 4 h. Dacă se dorește totuși o electroforeză peste noapte, aceasta poate fi efectuată la o încărcare redusă cum ar fi 6...8 mA. Frontul ce se deplasează este vizualizat prin amestecarea a 0,02% albastru de bromfenol în tamponul de acoperire. Electroforeza se consideră terminată când frontul ce se deplasează atinge partea de jos a gelului. Gelul separator este tăiat, colorat pentru aproximativ 30 min în soluție de fixare și din nou decolorat timp de 2h

în soluție de decolorare de 400 ml metanol, 140 ml acid acetic, și 2.000 ml apă. Soluția de fixare se prepară prin combinarea a 500 ml soluție de decolorare cu 12 ml de soluție de colorare cuprinzând 1 g albastru Coomassie, 50 ml apă, și 50 ml metanol. Benzile corespunzătoare proteinei au fost apoi făcute vizibile prin colorarea cu soluție de colorare așa cum se indică mai sus. Urmele făcute prin utilizarea tehnicii SDS-PAGE indică o creștere gradată a cantității de ribonuclează dimerizată în probele care spre final includ fracțiuni conținând multimeri la fel de bine. Toate fracțiunile ce au fost în majoritate în formă dimerică, au fost concentrate la un volum de 800 ml în sistem de curgere tangențial (Millipore). Diafragma membrană a fost clătită din nou cu 400 ml de permeat, astfel ca să rămână în final volumul total de 1200 ml soluție cu dimeri. După aceea, această soluție a fost liofilizată și stocată la 4°C până la etapa următoare. Liofilizarea a fost efectuată prin distribuirea soluției în porțiuni de aproximativ 200 ml în baloane cu fundul rotund. Baloanele au fost apoi introduse în azot lichid și înghețate la evaporatorul rotativ (Heidolph VV 60). Baloanele au fost apoi ermetic închise și stocate 30 min la - 30°C. În final, acest material a fost liofilizat utilizând procedeele standard de operare. Înainte de etapa următoare a procesului, monomerul de ribonuclează filtrat din etapa întâi de filtrare se colectează și se recirculă în procesul de dimerizare. În acest caz, fracțiunile de la etapa de filtrare care au fost mai întâi ribonuclează în formă monomer, se colectează și se concentrează la 4 l, utilizând sistemul de curgere tangențial identificat mai sus. Apoi fracțiunile monomerice se dimerizează, utilizând agentul de cuplare indicat mai sus. După etapa de cuplare, utilizând monomerii recirculați, procesul de filtrare se execută după cum se indică mai sus, și monomerii recirculați se obțin de această dată în formă dimerică. Liofilizatele obținute din primul proces de dimerizare sunt combinate cu liofilizatele dimerice obținute din reciclarea monomerilor. Amestecul

ribonuclează liofilizată combinat din etapele de mai sus este acum cromatografiat din nou pe Sephadex G50F în scopul obținerii unei separări îmbunătățite a dimerilor de monomeri și de oligomeri. Procedeu cromatografic se execută pe Sephadex G 50 F în coloană cu tampon 0,2 M acetat de sodiu la pH=5. Soluția tampon 0,2 M acetat de sodiu se prepară prin dizolvarea a 27,22 g acetat de sodiu trihidrat în 1,0 l apă. Cromatografierea s-a executat în condițiile de utilizare a aparatului indicate mai sus la prima etapă de filtrare.

În acest caz, s-a obținut din nou un profil de eluție, și acest profil poate fi văzut în fig.2. În această figură, linia groasă reprezintă profilul de absorbție al soluțiilor de ribonuclează, obținut prin utilizarea unei detecții mai sensibile decât în cea indicată de profilul cu linie mai subțire. Profilul de eluție al liniei mai sensibile arată un pic cu un conținut principal de dimer în cantitate mare, și numai două picuri secundare mai mici. Analiza SDS PAGE a enzimelor luate din fracțiunile picurilor arată o acumulare mai mare de dimeri în picul principal decât în cel al profilului de eluție al primei etape de filtrare.

Fracțiunile corespunzătoare picului principal au fost colectate și concentrate cu ajutorul sistemului de curgere tangențială descris mai sus. Pentru desalinizare, aceste fracțiuni colectate au fost trecute peste coloana cu Sephadex G 25. Coloana a fost de un diametru de 25,2 cm, și înălțimea de 65 cm, un volum de bază de 32 l, și a fost operată la o viteză de curgere de 15 l/h. Toate soluțiile ribonucleazei din picul principal a celui de-al doilea profil de eluție până la maximum de 5 l au fost înglobate în coloana de Sephadex. Desalinizarea s-a continuat utilizând tampon 50 molar de amoniu hidrogen carbonat. Ciclul de desalinizare a durat 90 min la care timp s-au colectat 5 l. Ceea ce a rămas din ciclu s-a descărcat. Un profil de eluție s-a înregistrat și conținutul corespunzător unui singur pic a fost colectat în balon Schott de cinci litri. Urme de probă de produs final purificat au fost selectate în condiții reduse cu *beta*-mercaptoetanol, cât și în formă neredusă.

Studiile SDS - PAGE asupra produsului final purificat au indicat că numai forma dimerică a ribonucleazei a fost prezentă.

În scopul plasării proteinei liofilizate în forma utilă din punct de vedere farmaceutic, a fost necesar să se elibereze dimerul ribonucleazei de endotoxine. Pentru aceasta, dimerii purificați au fost cromatografați, utilizând coloană cu Detoxigel. Pentru a obține calitatea maximă a materialului dimer ribonuclează dorit, a fost necesară utilizarea tamponelor în domeniul de pH fiziologic. Aceasta s-a înfăptuit prin adăugare de soluții saline. Soluțiile enzimei au fost înglobate în coloana de Detoxigel, și endotoxinele în cantitate de până la 1.500 E.U./ml au fost îndepărtate. Înainte și după fiecare ciclu, Detoxigelul a fost regenerat cu 1% dezoxicolat, urmat de clătirea completă cu apă până ce endotoxinele nu se mai puteau detecta în apa de clătire. Volumul coloanei a fost de 750 ml (diametrul de 9,5 cm, înălțimea de 14 cm), și coloana a fost echilibrată cu soluție 0,1 M de amoniu dicarbonat. Tamponul lipsit de endotoxină s-a amestecat cu apă sterilă. Soluția de ribonuclează în volum total de 2 l s-a colectat pe pat de gel și s-a lăsat să se îmbibe în gel (să fie adsorbită). Proteina a fost apoi eluată cu tampon pentru echilibrare și s-a colectat în pahar steril. Soluția a fost apoi trecută la liofilizarea într-un balon cu fund rotund steril.

Conținutul de endotoxină al preparatului s-a determinat cu o trusă de diagnosticare denumită "Coatest (R)". Acest test se bazează pe activarea lui *Limulus-Amoebocytin-Lysat* (LAL) cu endotoxine. LAL activat separă forma colorantului galben *p*-nitroanilină din substratul cromogenic (S-2423), și reducerea culorii este măsurată ca determinant al conținutului de endotoxină, la 405 nm prin spectrofotometru spectral. Producții dimeri de ribonuclează purificați conținuți sub 0,1 ng/ml au fost trecuți în baloane cu fundul rotund și apoi liofilizați. Produsul rezultat a fost o soluție de dimer de ribonuclează înalt purificat ce se poate menține până la următoarea utilizare.

Utilizând metoda de mai sus, se pot

obține cantități mari de produs ribonuclează dimer înalt purificat, și acest produs va fi extrem de util la tratarea unei varietăți de afecțiuni virale și bacteriene.

Testul de activitate al enzimei este următorul:

- activitatea enzimei dimerul ribonucleazei, preparat conform prezentei invenții, poate fi testat utilizând un test de activitate așa cum îl descrie Kanitz, *J.Gen.Physiol.* 24:15 (1940). Acest test se bazează pe faptul că, ca rezultat al influenței ribonucleazei asupra acidului ribonucleic, spectrul său de absorbție este deplasat în domeniul UV spre lungimi de undă mai scurte. În domeniul 290...305 nm, concentrația acidului nucleic descrește ca rezultat al digerației cu ribonuclează. În faza inițială de reacție, aceasta descrește, decurge liniar și poate fi utilizată spre a fi măsurată activitatea enzimatică. În acest test, scăderea cantității de acid nucleic este măsurată la 300 nm. Testul s-a efectuat la temperatura constantă de 25°C și s-au utilizat cuvete termostatate, astfel ca înainte de utilizare toate soluțiile să poată fi menținute timp de 5 min la temperatura de 25°C. Măsurătorile au fost făcute la 300 nm, utilizând fotometru spectral. Volumul de reacție a fost de 3 ml și reacția s-a efectuat în cuvete de 3 ml cu strat de grosime 1 cm.

Amestecul de reacție se prepară prin utilizarea a 1,5 ml soluție de acid ribonucleic, 0,05...0,5 ml probe de testat incluzând fracțiuni de ribonuclează, și apă în cantitate de până la 10 ml. Soluția de acid ribonucleic se prepară prin utilizarea a 80 mg acid ribonucleic și sare de sodiu dizolvată în 50 ml tampon acetat. Tamponul acetat se prepară ca tampon acetat 0,1 M la pH=5, prin amestecarea a 0,57 ml acid acetic glacial și 80 ml apă distilată, ajustarea pH-ului la 5 făcându-se cu hidroxid de sodiu 1N, și completarea până la 100 ml cu apă distilată, după care se execută o filtrare sterilă. Soluțiile probelor de testat, incluzând dimerii ribonucleazei, se prepară din 5 mg de probă dimer de ribonuclează dizolvată în 5 ml de apă distilată, diluată astfel ca valoarea măsurată să se situeze în domeniul favorabil.

Soluțiile de acid ribonucleic și probă de testat se amestecă în cuvetă și reducerea acidului nucleic se face timp de aproximativ 20 min, utilizând apoi pentru înregistrare spectrofotometru 1001. Se înregistrează profilul de absorbție, și domeniul liniar se examinează timp de aproximativ 8 min. Reacțiile se continuă la 25°C până la terminarea reacției, ceea ce apare după aproximativ 3 h. Soluțiile se măsoară din nou pentru determinarea valorii finale și măsurătorile se repetă de două ori pentru obținerea apoi a valorilor medii.

Pentru calcularea activității enzimatică, extincția acidului nucleic trebuie să fie determinată la începutul reacției (E_0), și extincția finală (E_e) a reacției la $\Delta E/\text{min}$ din domeniul inițial liniar. Diluția probei de testat de dimer de ribonuclează trebuie selectată astfel ca $\Delta E/\text{min}$ să nu fie mai mare de 0,007. O valoare martor este fixată pentru șarja de reacție făcută cu ribonuclează și apă, care poate fi scăzută din valorile măsurate. Unitatea enzimatică este definită ca și cantitatea de enzimă în condițiile de testare, produce o scădere de 100% pe minut a valorii $E_0 - E_e$ pentru un substrat de 25%°C. Valoarea cea mai mare posibilă pentru extincția observată la 300 nm este $E_0 - E_e$. Calculul activității specifice a enzimei se face după cum urmează:

$$3 \times (E/\text{min}) \text{ Factor de diluție} / (E_0 - E_e) \times \text{volum (ml) de soluție de probă.}$$

Enzimele dimerului ribonucleazei, conform prezentei invenții, au prezentat cantități semnificative de activitate enzimatică.

Fig. 1 și 2 sunt reprezentări grafice ale profilelor de eluare obținute via cromatografierea cu rășină schimbătoare de ioni în concordanță cu prezenta invenție.

Revendicări

1. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează care cuprinde fazele de:

a) preparare a unei soluții de ribonuclează prin adăugare de ribonuclează monomerică la o soluție tampon reglată la un pH de cel puțin aproximativ 9;

b) adăugare a unui reactiv de cuplare suberimidat în soluție de ribonuclează și efectuarea dimerizării monomerilor de ribonuclează în timp ce se menține pH-ul la cel puțin aproximativ 9;

c) oprirea reacției de dimerizare la un punct dat; și

d) purificarea soluției de ribonuclează dimerizată printr-un procedeu care cuprinde cromatografie lichidă, **caracterizat prin aceea că**, reacția de dimerizare din faza (c) este oprită prin scăderea pH-ului la valoarea de aproximativ 7 prin adăugarea de acid, după care amestecul rezultat este concentrat și supus purificării în conformitate cu faza (d), care cuprinde cel puțin două faze ulterioare de cromatografie lichidă unde, după prima fază de cromatografie lichidă, fracțiunile care conțin în special forma dimerică a ribonucleazei sunt colectate și concentrate și după aceea supuse la o a doua fază de cromatografie lichidă.

2. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, soluția de ribonuclează monomerică se reglează la un pH de circa 10, preferabil prin adăugare de NaOH.

3. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, soluția tampon din faza A cuprinde disodiu hidrogen fosfat dihidrat.

4. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, reactivul de cuplare se adaugă în soluția de ribonuclează monomerică în timp ce soluția este menținută la un pH de aproximativ 10.

5. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, reactivul de cuplare suberimidat cuprinde dimetil suberimidat.

6. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, faza (b) de dimerizare se efectuează

la temperatura camerei, preferabil în timp ce soluția este continuu agitată.

7. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 5 **că**, reacția de dimerizare se oprește prin adăugare de HCl.

8. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 10 **că**, soluția de ribonuclează dimerizată este concentrată înainte și/sau după prima fază de cromatografie lichidă folosind un sistem de curgere tangențială.

9. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 15 **că**, cel puțin o fază de cromatografie lichidă se efectuează folosind o matrice reticulată cu dextran cu un domeniu preferat de fracționare pentru peptide și proteine globulare cu greutate moleculară de 1500 până la 30000.

10. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 20 **că** se adaugă o parte din reactivul de culoare la o soluție de monomer de ribonuclează constituit din 10 părți de monomer de ribonuclează la 1000 părți soluție tampon, părțile fiind în greutate.

11. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 25 **că**, fracțiunile colectate după prima fază de cromatografie lichidă sunt liofilizate.

12. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 30 **că**, fracțiunile colectate după prima fază de filtrare care conțin, în principal, ribonuclează monomerică sunt reciclate

în faza (b) de dimerizare.

13. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 5 **că**, cel puțin o fază de cromatografie lichidă se efectuează folosind o rășină convenabilă, schimbătoare de ioni.

14. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 10 **că**, a doua fază de cromatografie lichidă se efectuează la un pH de circa 5, pH-ul fiind, preferabil, reglat cu un tampon de acetat de sodiu.

15. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 15 **că**, fracțiunile colectate în timpul primei și/sau celei de-a doua faze de cromatografie lichidă sunt analizate prin gel-electroforeză.

16. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 20 **că**, mai cuprinde o fază de desalinizare care, preferabil, se efectuează după a doua fază de cromatografie lichidă, cel mai bine cu ajutorul unei matrice reticulată cu dextran, cu un domeniu de fracționare pentru peptide și proteine globulare, cu greutate moleculară de 1000 până la 5000.

17. Procedeu de preparare a unui produs dimeric de ribonuclează, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** 25 **că**, mai cuprinde o fază de îndepărtare a endotoxinelor din soluția de dimer de ribonuclează, purificată, preferabil cu ajutorul cromatografiei pe gel folosind o matrice de cromatografie pe gel pentru detoxifiere, convenabilă.

Președintele comisiei de invenții: **farm. Pentelescu Elena**

Examinator: **farm. Anghel Doina**

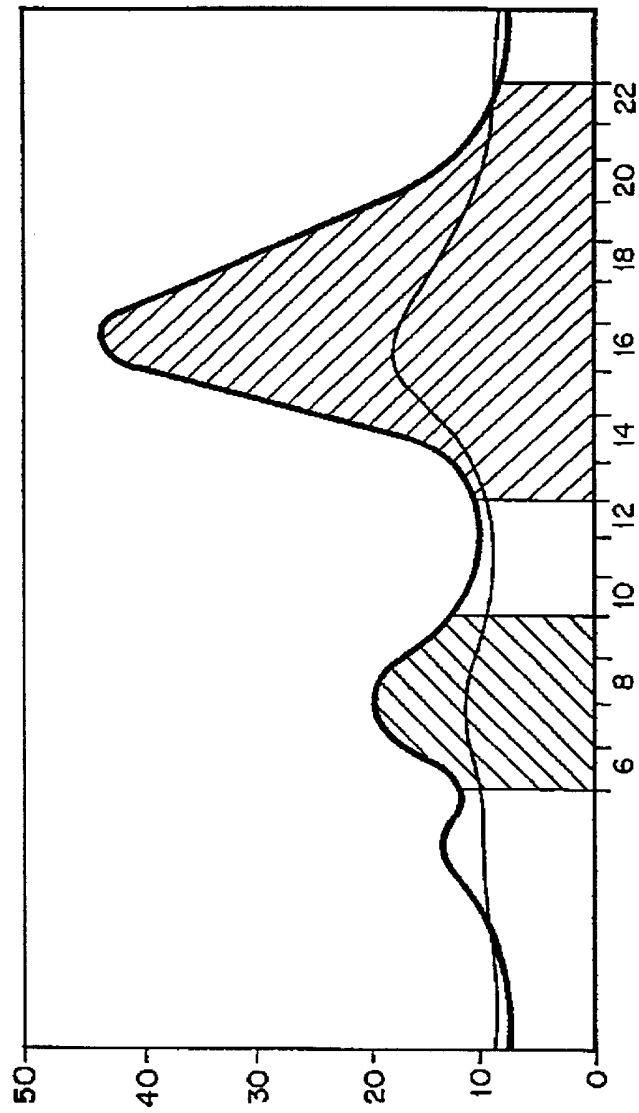


Fig. 1

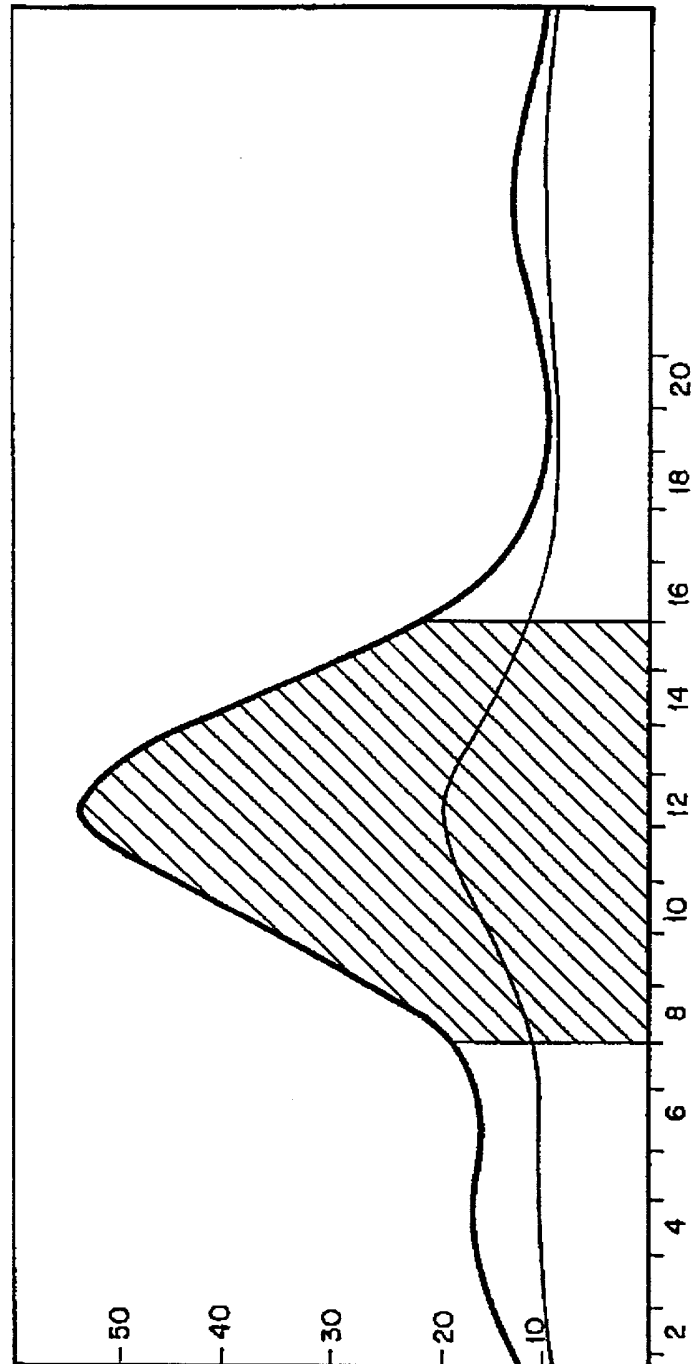


Fig. 2