

ELJÁRÁS OLDHATATLAN ZÁRVÁNYKÉNT EXPRIMÁLT REKOMBINÁNS

PROTEINEK TISZTÍTÁSÁRA

K I V O N A T

A találmány eljárás baktériumi gazdasejtben exprimált és oldhatatlan zár-
ványként (*inclusion bodies*) a sejtben tárolt rekombináns proteinek oldására és tiszt-
títására. A találmány szerinti eljárásra jellemző, hogy

- (i) az elválasztott oldhatatlan proteinaggregátumokat szerves denaturáló rea-
gensben feloldják,
- (ii) az (i) szerint kapott oldatot legalább egy kromatográfiás lépésben tisztítják
lényegében szervesetlen, pufferves, bázikus, sótartalmú eluens alkalmazá-
sával,
- (iii) az utolsó tisztító lépésben kapott, az oldott, renaturált és biológiailag aktív
proteint tartalmazó bázikus oldatot semlegesítik. Az eluensben lévő sók milyenségé-
nek és mennyiségének alkalmas megválasztásával az oldott tisztított protein mindjárt
fiziológiai sóoldatban van jelen.

jellemező a la ϕ
Fertus



PROTEINEK TISZTÍTÁSÁRA

A találmány eljárás baktériumi gazdasejtben exprimált és oldhatatlan zárványként (*inclusion bodies*) a sejtben tárolt rekombináns proteinek oldására és tisztítására. A tisztítási eljárás alapja, hogy a zárványokat szerves denaturáló reagensek segítségével oldhatóvá tesszük és ilyen formában kromatográfiás eljárásnak vetjük alá, amelynek során eluensként szerves, bázikus, sótartalmú oldatot alkalmazunk, mert így semlegesítés után a rekombináns protein közvetlenül alkalmazható, fiziológiailag elviselhető formában keletkezik. A találmány szerinti eljárás különösen előnyös allergének és allergén-változatok tisztítására.

A találmány szerinti eljárást gyógyszerkészítmények esetén szükséges körülmények között (GMP) valósítjuk meg. Az előállított gyógyászati hatóanyagok feloldásuk után közvetlenül parenterális beadásra alkalmazhatók. A találmány szerinti eljárással előállított előnyös rekombináns allergének vagy allergén-változatok allergiás megbetegedések mind javított terápiájában, mind diagnózisában alkalmazhatók.

Rekombináns proteinek baktériumi, ill. prokariota gazdasejtben, például *E. coli* sejtben történő előállításában gyakori probléma, hogy az exprimált protein nem a helyes, azaz természetes hajtogatásban van jelen, pedig általában a teljes biológiai aktivitáshoz ez kell. A meg nem felelő hajtogatás ahhoz vezet, hogy számos protein a közegben nem oldódik, ill. zárványként a gazdasejtben marad; ezek a formák „inclusion bodies”-ként bevonultak a tudományos irodalomba. Az oldhatatlan zárványok rossz hatással vannak az exprimált rekombináns protein tisztítására és biológiai hozzáférhetőségére (Marston és mtsai, 1986, *Biochem. J.* 240: 1-12). A baktériumokban bezárt rekombináns proteinek tisztítása céljából a kromatográfiás eluensekhez gyakran denaturáló anyagot, például karbamidot vagy guanidínium-



hidrokloridot adnak. Ezek az adalékok azonban nem minden tisztítási eljárás esetén alkalmazhatók, a hidrofób interakciós kromatográfiában például nem. Emellett kémiai reakciók a termék minőségét kedvezőtlenül befolyásolhatják (karbamid-oldatban keletkezhet például cianát). A denaturáló szer eltávolítása és így a protein renaturálása általában dialízissel, diaszűrőssel vagy gélszűrőssel történik. Ezek a folyamatok hosszadalmasak, emellett a termék gyakran újból kicsapódik. A fent említett denaturáló szerek teljes eltávolításának analitikai kimutatása is nehéz. A fenti probléma különösen a rekombináns allergének és allergén-változatok előállítása és tisztítása területén jelentős.

Az 1. típusú allergiák az utolsó évtizedek alatt világszerte drámai módon elterjedtek. Az iparosodott országok lakosságának akár 20 %-a szenved allergiás náthában, allergiás kötőhártyagyulladásban, hörgőasztmában. Ezeket a betegségeket különböző forrásokból (növényi pollen, atkák, emlősök, például macska, kutya, ló, valamint penészgomba) felszabaduló, a levegőben lévő allergének (aeroallergének) okozzák. Súlyos allergiát rovarcsipés, például méh- vagy darázs csipés is okozhat.

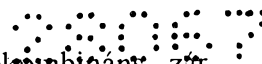
Az 1. típusú allergiákat kiváltó anyagok proteinek, glikoproteinek vagy polipeptidek. Miután az allergén a nyálkahártyán keresztül, ill. rovarcsipés útján a szervezetbe került, a szenzibilizált személy esetén hízósejtek felületén lévő IgE-antitestekkel reagál. Ha az allergén két vagy több antitestet összekötött, mediátorok (például hisztamin, prosztaglandinek) és citokinok kibocsátására és így az allergiás tünetek kiváltására kerül sor.

cDNS segítségével elő lehet állítani rekombináns allergének, amelyek az allergiák kezelésében és diagnosztikájában alkalmazhatók (Scheiner und Kraft, 1995, Allergy 50, 384-391). Különösen nagy jelentőségre a rekombináns allergének az olyan diagnosztikai módszerek esetén tehetnek szert, amelyek – a hagyományos kivonatokhoz viszonyítva – egyedi IgE-szenzibilizáló spektrumok azonosítását teszik



lehetővé. Ezen túlmenően a rekombináns allergéneket géntechnikával változtatni lehet, ezzel elérhető, hogy allergén potenciáljuk csökken, ugyanakkor a szabályozó T-segédsejtekkel való reakciókészségük változatlan marad (Schramm és mtsai, 1999, J. Immunol. 162 (4): 2406-2414; Valenta és mtsai, 1999, Biol. Chem. 380: 815-24; Singh és mtsai, 1999, Int. Arch. Allergy Immunol. 119: 75-85). Az ilyen allergén-változatok a jövőben nagy szerepet játszhatnak az 1. típusú allergiák fajlagos immunterápiájában. Különösen ezek a variált allergének a találmány szerinti eljárás tárgyai.

A fenti összefüggésben a rekombináns allergéneknek és allergén-változatoknak a gyakran alkalmazott baktériumi expressziós rendszerekben történő termelése különösen jelentős. Ezek a rendszerek - az eukariota rendszerekhez viszonyítva - azzal az előnnyel rendelkeznek, hogy már rövid expresszióidő elteltével nagy termelési hozam érhető el, emellett farmakológiai szempontból sokkal kevésbé rizikósak vírusos fertőzés vagy onkogének vonatkozásában. Különböző források fő allergénjei azonban - baktériumos expressziós rendszerekben történő előállításuk során - zárványként maradnak a gazdasajtban, így például a fűpollen-allergének 1. csoportja (Vrtala és mtsai, 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97: 781-7) és 13. csoportja (Suck és mtsai, 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332), a Der f 2 atka-allergén (Iwamoto és mtsai, 1996, Int. Arch. Allergy Immunol. 109: 356-61), valamint foszfolipáz A2 és hialuronidáz, két rovarméreg-allergén (Soldatova és mtsai, 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 101: 691-8; Kuchler és mtsai, 1989, Eur. J. Biochem. 184: 249-254). De az allergén-változatok, például a Bet v 1 nyírfapollen-főallergén fragmentumai és multimerjei (A-fragmentum, B-fragmentum, Bet v1-trimer) is így viselkednek annak ellenére, hogy a változatlan rekombináns Bet v1-allergén jól oldódik (Hoffmann-Sommergruber és mtsai, 1997, Prot. Expr. Purific. 9: 233-39; van Hage-Hamsten és mtsai, 1999, J. Allergy Clin. Immunol. 104: 969-7).



A feladat tehát olyan eljárás kidolgozása volt, amellyel rekombináns, zárványként jelen lévő proteinek, különösen allergének, ill. allergén hatású proteinek egyszerű és hatékony módon tisztíthatók, a technika állása szerinti eljárások hátrányai nélkül. További feladat az volt, hogy a kinyert proteinek a tisztítás alatt és főleg a tisztítás végén olyan formában legyenek jelen, amely lehetővé teszi, hogy további eljárási lépések nélkül, közvetlenül legyenek alkalmazhatók a gyógyászati vagy diagnosztikai felhasználásra.

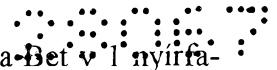
A jelen találmány szerinti eljárás biokémiai tisztítóeljárás, amellyel exprimálásuk után zárványként jelen lévő rekombináns proteinek egy- vagy többlépcsős, előnyösen egy-, két- vagy háromlépcsős tisztítással, lényegesen puffer nélküli bázikus eluens alkalmazásával tisztán kinyerhetők.

A találmány szerinti eljárás további ismérve, hogy a rekombináns protein az utolsó tisztítólépés után gyors semlegesítés révén oldatban marad. Ezzel egyidejűleg fiziológiai közeg jön létre.

Az eljárást különösen rekombináns allergének és allergén-változatok előállítására optimáltuk. Az eljárás ezekre az elsődleges expressziós termékekre egyaránt és általánosan alkalmazható, azaz más eredetű, elsődlegesen zárványként exprimált allergének és allergén-változatok is tisztíthatók, renaturálhatók és készítménnyé alakíthatók a találmány szerinti eljárással.

A találmány értelmében allergén-változaton az eredeti allergén fragmenseit, multimerjeit, például dimerjeit vagy trimerjeit, de az eredeti allergének, fragmenseik/multimerjeik módosított változatait is értjük. Az utóbbiak inzertált darabokkal, deletált szakaszokkal, egy vagy több aminosav helyett más aminosavval rendelkeznek.

Előnyösen rekombináns, a természetben elő nem forduló olyan allergén-változatokat tisztítunk, amelyeknek nincs vagy csökkentett az IgE-aktivitása, ugyan-



akkor a T-sejt-aktivitása megmarad. Az eljárás különösen alkalmas a Bet v1 nyírfa-pollen-főallergén allergén-változatainak, mégpedig a rekombináns A-fragmensnek (1-74. aminosav) és a rekombináns B-fragmensnek (75-164. aminosav), valamint egy rekombináns trimer kinyerésére. Az eljárással előállított rekombináns allergének és allergén-változatok kiválóan jól alkalmazhatók allergiás megbetegedések fajlagos immunterápiájában és diagnosztikájában.

A találmány tárgya tehát eljárás tisztított rekombináns proteinek előállítására oldható, biológiailag aktív formában, fiziológiai, közvetlenül a gyógyászati felhasználásra alkalmas közegben, baktériumi expresszió után az expressziós közegben oldhatatlan proteinaggregátumokból. Az eljárásra az alábbi lépések jellemzőek:

- (i) az elválasztott oldhatatlan proteinaggregátumokat szerves denaturáló reagensben felvesszük,
- (ii) az (i) szerint kapott oldatot legalább egy kromatográfiás lépésben tisztítjuk lényegében szervesetlen, puffer nélküli bázikus, sótartalmú eluens alkalmazásával,
- (iii) az utolsó tisztító lépésben kapott, az oldott, renaturált és biológiailag aktív proteint tartalmazó bázikus oldatot semlegesítjük.

Tisztítás céljából az elsődlegesen keletkezett oldhatatlan zárványokat először önmagukban ismert denaturáló reagensekben oldjuk és ezzel denaturáljuk. Előnyösen karbamidot alkalmazunk, különösen 5-10 mólos, előnyösen 8 mólos oldatként. Alternatív megoldás, hogy más reagenst, például nagyobb koncentrációjú nátrium-hidroxid- vagy kálium-hidroxid-oldatot (0,2 M – 1 M) vagy a fent említett guanidínium-hidrokloridot alkalmazzuk.

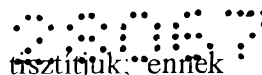
A következő lépésben az oldott, denaturált proteint alkalmas kromatográfiás hordozóhoz kötjük. Elsősorban ioncserélő gyanta, előnyösen anioncserélő gyanta jöhet számításba.



A kromatográfiás tisztításhoz eluensként a találmány értelmében lényegében szervetlen, puffermentes, bázikus, sótartalmú oldatot alkalmazunk. Alkalmas eluensek például NaOH- vagy KOH-oldat, amely nátrium-kloridot vagy kálium-kloridot tartalmaz. Az eljárás egy előnyös megvalósítása értelmében az eluenshez nátrium- vagy kálium-hidrogén-karbonátot adhatunk, így lehetőség van a pH-érték csökkentésére. Előnyös eluensek nátrium-hidroxidot, nátrium-kloridot, ill. nátrium-hidroxidot, nátrium-kloridot és nátrium-hidrogén-karbonátot tartalmaznak. A vizes bázikus oldat NaOH-, ill. KOH-tartalma a találmány értelmében 5 mM és 50 mM közötti, előnyösen 15-25 mM, különösen előnyösen 20 mM. A sókoncentráció (például NaCl) az elején viszonylag alacsony, így a protein erősen rögzül az ioncserélő gyantán. A találmány szerint a kezdeti sókoncentráció 5-50 mM, előnyösen 15-30 mM, különösen előnyösen 20 mM. Ezzel az ioncserélő gyantához nem vagy nem elég erősen kötődő denaturálószer, valamint a szennyeződések eltávolítjuk. Amennyiben az eluens nátrium-hidrogén-karbonátot is tartalmaz, annak koncentrációja 5-15 mM, előnyösen 11 mM.

A találmány szerinti eljárás során a denaturáló reagenst a denaturált protein oldatából úgy távolítjuk el, hogy az oldott rekombináns proteint kromatográfiás hordozóhoz kötjük, majd a denaturáló oldatot lényegében szervetlen, puffermentes, bázikus eluensre cseréljük, amelynek sókoncentrációja elegendő ahhoz, hogy a proteinnek a hordozóhoz való rögzítését biztosítsa.

A megkötött rekombináns protein eluálása céljából a találmány szerinti eljárásban az egyéb feltételek változatlan maradása mellett a sókoncentrációt (NaCl vagy KCl) gradiensként fokozatosan emeljük. A gradiens előnyösen lineáris, kezdeti értéke mintegy 20 mM NaCl (KCl), végső értéke 0,5 M. Ezzel nemcsak a kívánt proteint nyerjük, hanem további szennyeződésektől (például más proteinektől) tisztítjuk is azt. A találmány szerinti eljárásra tehát jellemző, hogy a kötött rekombináns proteint



a sókoncentráció emelésével eluáljuk és ezzel szennyeződésektől tisztítjuk; ennek során a sókoncentráció emelése előnyösen gradiens segítségével történik.

Néhány esetben az eluált protein a követelményeknek megfelelően elegendően tiszta, ez esetben további tisztítási lépésre nincs szükség. Az ilyen esetekben közvetlenül következik a továbbiakban közelebbről ismertetett semlegesítési lépés, amellyel használatra kész, aktív proteint nyerünk.

Máskülönben a találmány értelmében további kromatográfiás lépés következik. Elvileg minden ismert kromatográfiás eljárás alkalmazható. A konkrét esetben az adott protein kémiai-fizikai tulajdonságaitól függ az eljárás megválasztása. Előnyösen, különösen a Bet v 1 típusú allergének és allergén-változatok esetében a további tisztítást hidrofób interakciós kromatográfiás eljárással végezzük. Alternatív módszer a gélszűrés.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös megvalósítási módja szerint a tisztítás három lépésben történik: ioncserélőn végzett kromatográfiás eljárás, hidrofób interakciós kromatográfiás lépés és gélszűrés, előnyösen az itt közölt sorrendben. Ez azonban nem jelenti a találmány szerinti eljárás korlátozását.

A találmány további tárgya tehát olyan eljárás is, amely legalább egy további kromatográfiás lépést, előnyösen hidrofób interakciós kromatográfiás lépést és/vagy gélszűrést foglal magában.

A találmány szempontjából lényeges a különböző említett tisztítási lépésekben, hogy az eluens fent már részletesen leírt mennyiségi és minőségi összetétele azonos: NaOH, NaCl és előnyösen NaHCO₃, ill. a megfelelő káliumvegyületek. Csupán a nátrium-klorid koncentrációját a különböző lépésekben variálhatjuk. Így például a hidrofób interakciós kromatográfiás módszer esetén az NaCl (KCl)-gradiens nagy (1-3 M, előnyösen 2 M) koncentrációtól → alacsony koncentráció (30-10 mM, elo 20 mM) felé csökken. A végső koncentráció lényegében attól függ, mi-



Ilyen sókoncentrációt kívánunk az utolsó tisztító lépés után a termékben. A találmány értelmében ez a koncentráció előnyösen egy fiziológiailag elviselhető oldat sókoncentrációjának felel meg. Ha az előnyös háromlépéses tisztítási eljárásban a gélszűrés az utolsó lépés, kb. 150 mM koncentrációjú NaCl-oldatot alkalmazunk. Végül a sókoncentráció kívánt végértékét az utolsó lépés után hígítással vagy só adagolásával is beállíthatjuk, aminek során a mennyiség a kromatografált protein mennyiségétől függ.

Az utolsó tisztítási lépés - előnyös kivétel esetén a gélszűrés - után az oldat semlegesítése, ill. a protein renaturálizása következik, mégpedig híg sav, előnyösen sósav adagolásával, a pH-érték 6,5-8,0 értékre állításával. Az aktív rekombináns proteint tartalmazó oldatot, adott esetben a sótartalom (például Na^+) és protein-tartalom beállítása után formulázott formában közvetlenül alkalmazható.

A találmány szerinti eljárásra tehát az is jellemző, hogy a tisztítás befejeztével a semlegesítést 6,5 és 8,0 közötti pH-tartományban végezzük és előnyösen híg savat, különösen előnyösen híg sósavat használunk a pH-érték beállításához.

Az alábbiakban a találmány szerinti eljárást a Bet v 1 nyírfapollen-főallergén allergénváltozatainak, mégpedig a rekombináns A-fragmensnek (1-74. aminosav) és a rekombináns B-fragmensnek (75-164. aminosav), valamint a rekombináns trimernek kinyerése kapcsán közelebbről ismertetjük.

Az elsődleges oldhatatlan zárványokat denaturáljuk, előnyösen 8 mólos (mól/l) karbamid-oldattal. Alternatív más denaturálószer, például 0,2 M nátrium-hidroxid-oldatot is alkalmazhatunk. Az első kromatográfiás tisztítási lépés anioncserélő gyantán, például Source Q gyantán végzett kromatográfiás eljárás. Az allergének és allergén-változatok zöme a hordozóhoz kötődik, így a kezdeti denaturáló oldatból az eluensbe kerülnek. A bázikus eluens hatására a proteinek oldatban



maradnak. Az NaCl-gradiens révén a baktériumos szennyeződések és hatóanyag-fragmensek széthúzva oldódnak le.

Két további lépésben, a hidrofób interakciós kromatográfiás lépésben és a gélszűrés során az előtisztított allergéneket és allergén-változatokat lényegében még megmaradt baktériumos szennyeződésektől tisztítjuk. Itt alapvetően azonos alkotórészeket, azaz kis koncentrációjú bázist és változó részarányú sót tartalmazó eluent alkalmazunk. A találmány értelmében alkalmazott eluens a proteineket kimélő módon oldatban tartja és hatékony tisztítást tesz lehetővé. Az utolsó tisztítási lépés után a tisztított rekombináns proteint a találmány szerint az eluensben lévő bázis egyszerű, megfelelő savval végzett semlegesítésével oldható formában nyerhetjük vagy renaturálhatjuk. Ha az eluens alkotórészeinek koncentrációját megfelelően választottuk, parenterális beadásra alkalmas fiziológiai oldat keletkezik. A tisztított rekombináns allergének vagy allergén-változatok azonosítása az ismert fizikai, kémiai, immunológiai vagy biológiai tulajdonságaikon keresztül történik, különösen elektromos fókuszálással, SDS-PAGE módszerrel, fajlagos monoklonális antitestekkel, valamint allergiás emberek IgE-antitesteivel. Az oldószert pH-méréssel, valamint az Na^+ , Cl^- és adott esetben CO_3^{--} -koncentráció meghatározásával vizsgáljuk. Ezek az eljárások általánosan ismertek és leírtak. A találmány szerint tisztított és oldott rekombináns allergének és allergén-változatok hozama 75-95 %, a kiindulási elsődleges proteinre vonatkoztatva.

A fentiek szerint előállított allergén-komponensek a betegre fajlagos szenzibilizáló-spektrum allergén-komponens szerinti felbontású azonosításának keretében in vivo és in vitro végzett diagnosztikában, valamint allergiák fajlagos immunterápiájában alkalmazhatók. A tisztított rekombináns proteinekből készletetett hatóanyagleadású gyógyászati készítmények is készíthetők.



A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósítási módja az alábbi váz-

latban (1. táblázat) látható.

1. táblázat

A zárványok izolálása

anioncserélő gyantán, például Source Q gyantán végzett kromatográfiás tisztítás, A-oldat: 20 mM NaOH, 20 mM NaCl, 11 mM NaHCO₃
B-oldat: 20 mM NaOH, 0,5 M NaCl, 11 mM NaHCO₃

adott esetben hidrofób interakciós kromatográfiás tisztítás, például Source PHE gyantán

A-oldat: 20 mM NaOH, 2 M NaCl, 11 mM NaHCO₃
B-oldat: 20 mM NaOH

adott esetben gélszűrés, például Superdex 75,
A-oldat: 10 mM NaOH, 11 mM NaHCO₃, 148,4 mM NaCl

renaturálás, készítménnyé alakítás
célprotein 10 mM NaOH, 148,4 mM NaCl, 11 mM NaHCO₃ oldatában
+ 100 mM HCl ad 10 mM = oldott célprotein 0,154 M Na⁺-oldatban.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a találmány szerinti eljárás, amelyre a kromatográfiás eluens különleges összetétele, a kromatográfiás módszerek megválasztása, a pH-érték és ezzel a sótartalom speciális beállítása jellemző, technológiailag és farmakológiailag a gyakorlatba átültethető termelési módszert kínál igen tiszta, oldható rekombináns allergének és allergén-változatok kinyerésére az elsődlegesen előállított oldhatatlan aggregátjaikból, csekély munka- és időráfordítás mellett. Tekintettel arra, hogy a rekombináns proteinek tisztítása, renaturálása, ill. oldatba vitele során alkalmazott körülmények az ismert módszerekhez képest - kimélők és farmakológiailag alkalmasak, a hatóanyagok allergiás betegségek diagnosztizálásában, valamint parenterális terápiájában alkalmazhatók.

Példa

Bet v 1 oldható allergén-változatainak kinyerése (a rekombináns Bet v 1 terápiailag hatásos allergén-változatai: A-fragmens, B-fragmens, Bet-v1-trimer)

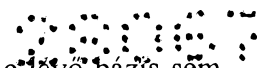


Az allergén-változatok szabvány módszerekkel tisztított záróanyagait előnyösen

8 M karbamid, 20 mM trisz/HCl oldattal denaturáljuk. A teljes denaturálás után az oldatot szűrőssel (előnyösen 0,22-0,45 μm) vagy centrifugálással (előnyösen 10.000 – 20.000 g, 5-15 perc) tisztítjuk. A derített oldatot ioncserés kromatográfiás eljárással előzetesen bázikus oldattal, előnyösen 20 mM NaOH, 11 mM NaHCO_3 és 20 mM NaCl oldatával kiegyensúlyozott Source 15Q hordozóra (Pharmacia) feladjuk. A hordozónak 12,0 pH-ig stabilnak kell lennie. A kezdő oldat viszonylag magas pH-értéke miatt a legtöbb célprotein az anioncserélő gyantához kötődik; kivételt csak azok a nagyon ritka proteinek képeznek, amelyeknek az izoelektromos pontja 11,0 pH felett van. Az immobilizált proteinek kezdő oldattal öblítve a denaturáló oldatot (például 8 mól/ karbamid-oldatot), valamint a farmakológiailag kedvezőtlen pufferanyagot (például trisz) hatékonyan eltávolítjuk. Ez az eljárás azt biztosítja, hogy a rekombináns protein oldhatóságának megtartása mellett áttérünk olyan oldószerre, amely a következő elkülönítő lépéseket lehetővé teszi. Az ezt követő eluálás növekvő NaCl-gradienssel (például 20 mM NaOH, 11 mM NaHCO_3 , 20 mM NaCl $\rightarrow$ 20 mM NaOH, 11 mM NaHCO_3 , 0,5 M BaCl) történik, hatása a szennyeződések (gazdasejt-proteinek) és hatóanyag-fragmensek elválasztása.

A következő kromatográfiás lépés a hidrofób interakciós kromatográfiás eljárás (csak fragmenseknek). Az 1. lépésben kapott eluált oldatot tömény sóoldattal, például 5 M NaCl, 20 mM NaOH, 11 mM NaHCO_3 oldattal úgy állítjuk be, hogy a célprotein kötődik. A rögzített célprotein eluálása sóban szegény vagy sómentes bázikus oldattal, például 20 mM nátrium-hidroxid-oldattal történik. A hidrofób interakciós kromatográfiás eljárásban alkalmazott hordozónak szintén pH 12,0-ig stabilnak kell lennie (például Source PHE).

Harmadik lépésként géliszűrést végzünk, például Superdex 75-ös szűrőanyaggal, bázikus körülmények között. Az oldatot úgy választjuk meg (például



10 mM NaOH, 11 mM NaHCO₃ és 148,4 mM NaCl), hogy a benne lévő bázis semlegesítése a kívánt végső készítményt eredményezze.

A gélszűrés eluátumát végül az alkalmazott bázisnak megfelelő savval semlegesítjük, ami egyrészt semleges pH-értékhez vezet, így a protein oldhatóvá válik, renaturálódik, másrészt a semlegesítéssel a kívánt sótartalom jön létre. Ha a gélszűrés után kapott oldat koncentrációja például 10 mM NaOH, 11 mM NaHCO₃ és 148,4 mM NaCl, és 1/10 térfogatnyi 100 mM sósavat adunk hozzá, az eredmény fiziológia NaCl-oldat (sókoncentráció szempontjából). Az oldatot a pH-érték és az Na⁺-koncentráció mérésével ellenőrizzük.

A találmány szerinti eljárás jellemzői közül tehát említésre méltó a vett minták minimális kezelése, kizárólag farmakológiailag kompatibilis anyagok alkalmazása, egyetlenegy eluens különböző elválasztási eljárásokban, a hosszadalmas és általában nem számszerűsíthető eljárások, például dialízis mellőzése. Emellett a hatékony baktériostatikumként ismert nátrium-hidroxid-oldat megakadályozza, hogy a benne lévő proteinek mikroorganizmusok által degradálódnak vagy szennyeződnek. A baktériumos expresszió során esetleg problémás endotoxinok szintén eltávolításra, ill. degradálásra kerülnek. A fent leírt kromatográfiás lépések sorrendjét és számát a célprotein fizio-kémiai tulajdonságaitól függően variálhatjuk. Az oldatokra nyújt áttekintést a 2. táblázat.

Semlegesítés/oldatba vitel a gélszűrés után:

lassan 1/10. térfogat (eluátum = 1) 100 mM sósavat adagolunk. Ha 100 ml kiindulási oldatban: 010 mM NaOH, 148,4 mM NaCl és 11 mM NaHCO₃ van, a semlegesítés utáni 110 ml-ben:

$$11 \text{ mM NaHCO}_3 \cdot 10/11 = 10 \text{ mM NaHCO}_3$$

$$10 \text{ mM NaOH/HCl (NaCl)} \cdot 10/11 = 9,1 \text{ mM NaCl}$$

$$148,4 \text{ mM NaCl} \cdot 10/11 = 134,9 \text{ mM NaCl. A kész oldat sóösszetétele tehát}$$

154 mM Na⁺, 144 mM Cl⁻, 10 mM CO₃²⁻.

2. táblázat:

Bet v 1 változatok kromatográfiás elválasztásában alkalmazható oldatok

Módszer/protein	Mintafelvitel	A-oldat	B-oldat
anioncserés krom.			
1. fragmens	8M karbamid, 20 mM trisz/HCl, pH 8,0	20 mM NaOH, 10 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	20 mM NaOH, 500 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃
2. fragmens	lásd fent	lásd fent	lásd fent
Trimer	lásd fent	lásd fent	20 mM NaOH, 800 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃
Hidrofób interakciós krom.			
1. fragmens	1. lépés eluátumát 2M NaCl-re beállítani	20 mM NaOH, 2M NaCl, 11 mM NaHCO ₃	20 mM NaOH
2. fragmens	1. lépés eluátumát 3M NaCl-re beállítani	20 mM NaOH, 3M NaCl, 11 mM NaHCO ₃	20 mM NaOH
Trimer	-	-	-
Gélszűrés			
1. fragmens	2. lépés eluátuma	10 mM NaOH, 148,4 mM NaCl, 11 mM NaHCO ₃	-
2. fragmens	lásd fent	lásd fent	-
Trimer	Q-oldat	lásd fent	-

Az összes oldatot és frakciót szobahőmérsékleten tároltuk. A gradiens térfogata minden esetben az oszloptérfogat tízszerese volt.



Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás tisztított rekombináns proteinek előállítására oldható, biológiailag aktív formában, fiziológiai, közvetlenül a gyógyászati felhasználásra alkalmas közegben, baktériumi expresszió után az expressziós közegben oldhatatlan proteinaggregátumokból („inclusion bodies”), *azzal jellemezve*, hogy

- (i) az elválasztott oldhatatlan proteinaggregátumokat szerves denaturáló reagensben feloldjuk,
- (ii) az (i) szerint kapott oldatot legalább egy kromatográfiás lépésben tisztítjuk lényegében szervesetlen, pufferves, bázikus, sómentes eluens alkalmazásával,
- (iii) az utolsó tisztító lépésben kapott, az oldott, renaturált és biológiailag aktív proteint tartalmazó bázikus oldatot semlegesítjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy denaturáló reagensként karbamidot vagy guanidínium-hidrokloridot alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a denaturáló reagens eltávolítására az oldott rekombináns proteint kromatográfiás hordozóhoz kötjük, majd a denaturáló oldatot lényegében szervesetlen, pufferves, bázikus, sókoncentrációjánál fogva a proteinnek a hordozóhoz való kötését biztosító eluenssel lecseréljük.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kötött rekombináns proteint a sókoncentráció emelésével eluáljuk és szennyeződésektől mentesítjük.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sókoncentrációt gradienssel emeljük.

6. A 3-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kromatográfiás hordozóként anioncserélő gyantát alkalmazunk.

7. A 3-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy további kromatográfiás tisztítólépést végzünk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy további kromatográfiás lépésként hidrofób interakciós kromatográfiás eljárást és/vagy gélszűrést végzünk.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kromatográfiás eluensként lényegében NaOH, NaHCO₃ és NaCl oldatát alkalmazzuk.

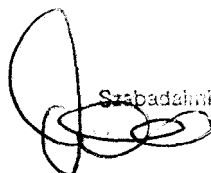
10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tisztítás után a semlegesítést 6,5 és 8,0 közötti pH-tartományban végezzük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a semlegesítéshez sósavat alkalmazzunk.

12. Az 1-10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns proteinként allergéneket, allergén-változatokat vagy allergének vagy allergén-változatok fragmenseit alkalmazzuk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Bet v 1 allergén rekombináns allergén-változatait alkalmazzuk.

A meghatalmazott:

 **DANUBIA**
Szabadalmi és Védjegyiroda Kft.
5.

1.5. oldal
Revis