



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 030 142 A1** 2009.12.31

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 030 142.6**

(22) Anmeldetag: **27.06.2008**

(43) Offenlegungstag: **31.12.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 1/22** (2006.01)

(71) Anmelder:

**QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE**

(74) Vertreter:

**König Szynka Tilmann von Renesse, 40549  
Düsseldorf**

(72) Erfinder:

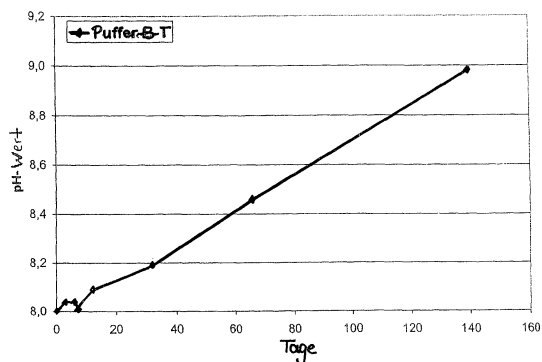
**Deutschmann, Thomas, Dr., 42349 Wuppertal, DE;  
Schäfer, Frank, Dr., 40627 Düsseldorf, DE; Block,  
Helena, 40724 Hilden, DE**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Anwendungspuffers zur Aufreinigung von Proteinen über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine definierte Menge eines Pufferkonzentrates mit definiertem pH-Wert mit einer definierten Menge eines Harnstoffkonzentrates gemischt wird, wodurch ein Anwendungspuffer mit definiertem pH-Wert bereitgestellt wird. Erfindungsgemäß wird ferner ein entsprechendes Kit bereitgestellt. Die Komponenten sind lagerungsstabil und erzeugen durch Mischung einen Anwendungspuffer definierter Zusammensetzung mit definiertem pH-Wert. Die Notwendigkeit zur pH-Justierung oder Neuansatz entfällt. Daher ist die Erfindung automatisiert und als geschlossenes Kit-Konzept einsetzbar.



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Proteinaufreinigung sowie dafür geeignete Kits und Puffersysteme.

**[0002]** Zur Aufreinigung von Proteinen über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (im Folgenden: IMAC) unter denaturierenden Bedingungen werden üblicherweise entweder Guadiniumhydrochlorid-haltige Puffer (siehe Hochuli et al. 1988) oder hochkonzentrierte, harnstoffhaltige Pufferlösungen eingesetzt. Harnstoffhaltige Pufferlösungen bieten den Vorteil gegenüber Guadiniumhydrochlorid-haltigen Puffern, dass die mit harnstoffhaltigen Pufferlösungen aufgereinigten Proteine direkt auf SDS-Gele analysiert werden können. Die optimale Bindung der Proteine an die Matrix, die Stringenz der Waschschritte, sowie die effiziente Elution des interessierenden Proteins hängen entscheidend vom pH-Wert der einzelnen Pufferlösungen ab.

**[0003]** Die im Stand der Technik bekannten harnstoffhaltigen Pufferlösungen verlieren jedoch ihre Pufferwirkung über die Zeit, insbesondere, da ihr pH-Wert ansteigt. Dadurch wird die Stringenz der Waschschritte und somit die Selektivität der Proteinaufreinigung herabgesetzt. Aufgrund des höheren pH-Wertes werden Proteine unspezifisch an die Matrix gebunden und können nicht mehr effizient ausgewaschen werden. Auch nimmt die Elutionseffizienz ab. Zur Aufreinigung His-getaggtter rekombinanter Proteine über IMAC unter denaturierenden Bedingungen müssen daher die verwendeten harnstoffhaltigen Pufferlösungen vor jeder Verwendung frisch angesetzt oder ihr pH-Wert muss korrigiert, d. h. neu eingestellt werden. Das ist zeitaufwendig und entsprechend nachteilig.

**[0004]** Davon ausgehend ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Proteinaufreinigung bereitzustellen.

**[0005]** Die Lösung der oben gestellten Aufgabe ergibt sich durch die in den Ansprüchen 1 bis 16 beschriebenen Verfahren, Kits und Puffersysteme.

**[0006]** Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Anwendungspuffers zur Aufreinigung von Proteinen über IMAC unter denaturierenden Bedingungen bereitgestellt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine definierte Menge eines Pufferkonzentrates mit definiertem pH-Wert mit einer definierten Menge eines denaturierenden Konzentrates, vorzugsweise eines Harnstoffkonzentrates gemischt wird, wodurch ein Anwendungspuffer mit definiertem pH-Wert bereitgestellt wird.

**[0007]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Er-

findung werden die Begriffe „Pufferkonzentrat“ und „Anwendungspuffer“ verwendet. Der Begriff „Pufferkonzentrat“ bezieht sich auf Pufferlösungen, die nicht direkt zur Aufreinigung eingesetzt werden, sondern erst mit Harnstoff vermischt werden, um den eigentlichen Anwendungspuffer zu erhalten. Die Pufferkonzentrate weisen vorzugsweise keinerlei Harnstoff auf. Zunächst liegt Harnstoff nicht in störenden Mengen vor. Der Begriff „Anwendungspuffer“ wird für Pufferlösungen verwendet, welche bereits mit Harnstoff gemischt und direkt zur Proteinaufreinigung eingesetzt werden können, bspw. als Binde-, Wasch- oder Elutionspuffer.

**[0008]** Kern der vorliegenden Erfindung ist die separate Bereitstellung der zur Proteinaufreinigung notwendigen Komponenten, die miteinander reagieren und so zu einem Anstieg des pH-Wertes führen können. Erfindungsgemäß wird wenigstens ein Pufferkonzentrat mit definiertem und entsprechend voreingestelltem pH-Wert separat von dem Harnstoffkonzentrat bereitgestellt. Eine definierte Menge des Harnstoffkonzentrates wird erst kurz vor der Anwendung mit einer definierten Menge des Pufferkonzentrates gemischt, wodurch ein Anwendungspuffer mit definierter Zusammensetzung und definiertem und entsprechend gewünschtem pH-Wert erhalten wird. Der Vorteil der separaten Bereitstellung der Konzentrate liegt darin, dass die Einzelkomponenten (Pufferkonzentrat und Harnstoffkonzentrat) lagerungsstabil sind und der pH-Wert der separat gelagerten Konzentrate über einen langen Zeitraum konstant bleibt (siehe auch [Fig. 3](#)). Durch die Vermischung von nur zwei Komponenten, nämlich des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat, kann selbst nach langer Lagerung der Konzentrate ein Anwendungspuffer mit definierter Zusammensetzung und definiertem pH-Wert erzeugt werden (siehe [Fig. 4](#)). Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist im Unterschied zum Stand der Technik daher kein erneutes Einstellen des pH-Wertes vor oder während der Proteinaufreinigung notwendig. Auch entfällt ein vollständiger Neuanfang der Anwendungspuffer. Nach Mischen der Konzentrate ist der Anwendungspuffer direkt einsetzbar. Für den Anwender ist die Verwendung entsprechender „ready-to-use“ Reagenzien insbesondere in einem Kit-Format arbeitserleichternd und zeitsparend. Da erfindungsgemäß immer ein Anwendungspuffer gleicher Zusammensetzung und mit definiertem (gleichem) pH-Wert erzeugt wird, sind die Aufreinigungsergebnisse reproduzierbar und von gleich bleibender Qualität. pH-Wert bedingte Schwankungen der Anwendungspuffer und damit verbundene Fehlerquellen werden vermieden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht nur im manuellen Format anwenderfreundlich, sondern zudem automatisierbar, da lediglich die Komponenten miteinander gemischt werden müssen, jedoch keine Feinjustierung oder ein Neuanfang der Anwendungspuffer erforderlich ist. Eine Automatisierung war mit den im Stand der Technik

bekannten Puffersystemen und Verfahren schlecht möglich. Aufgrund der fehlenden pH-Stabilität waren ferner auch keine lagerungsfähigen, geschlossenen Kit-Konzepte (bei denen keine Änderungen des Anwenders an den Puffern vorgenommen werden) möglich, da der Anwender Veränderungen an den bereitgestellten Puffern vornehmen musste (bspw. pH-Wert Einstellung).

**[0009]** Das erfindungsgemäße Verfahren findet insbesondere Anwendung in der Aufreinigung His-getaggtter Proteine mittels der Ni<sup>2+</sup>-NTA(Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Chromatographie.

**[0010]** Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden drei Pufferkonzentrate bereitgestellt, die jeweils unterschiedliche, bereits voreingestellte pH-Werte aufweisen. Die Zusammensetzung der Pufferkonzentrate kann gleich oder verschieden sein. Durch Mischen dieser Konzentrate mit einer definierten Menge Harnstoff erhält man wenigstens drei Anwendungspuffer mit jeweils unterschiedlichem pH-Wert. Die drei grundlegenden Schritte des Verfahrens, Bindung an die Matrix, Waschen der Matrix und die anschließende Elution des interessierenden Proteins von der Matrix benötigen jeweils Puffer mit speziell angepassten, d. h. eingestellten pH-Werten (siehe oben). Durch die Bereitstellung von wenigstens drei Pufferkonzentrate mit unterschiedlichem pH-Wert werden durch Mischung mit einer definierten Menge an Harnstoffkonzentrat wenigstens drei Anwendungspuffer hergestellt, die nicht nur eine definierte Zusammensetzung sondern auch definierte und für den jeweiligen Schritt angemessene, bzw. erforderliche pH-Werte besitzen. Diese Anwendungspuffer sind direkt, d. h. ohne weitere Modifizierungen durch den Anwender bzw. in einem automatisierten Verfahren einsetzbar.

**[0011]** Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist das Pufferkonzentrat, welches zur Herstellung des Anwendungspuffers zur Bindung eingesetzt wird, einen alkalischen pH-Wert auf, bevorzugt einen pH-Wert von 7,0 bis 9,0, besonders bevorzugt einen pH-Wert von ca. 7,5. Durch Mischung dieses Pufferkonzentrates mit einer definierten Menge des Harnstoffkonzentrates wird ein Anwendungspuffer mit gleichem oder höherem pH-Wert erzeugt. Gemäß einer Ausführungsform weist der Anwendungspuffer zur Bindung einen alkalischen pH-Wert auf, bevorzugt einen pH-Wert von 7,0 bis 9,0, besonders bevorzugt einen pH-Wert von ca. 8. Der Bindepuffer kann auch als Lysepuffer eingesetzt werden und umgekehrt.

**[0012]** Das Pufferkonzentrat, welches zur Herstellung des Anwendungspuffers zum Waschen der Matrix eingesetzt wird, weist gemäß dieser Ausführungsform einen leicht sauren pH-Wert auf, bevorzugt einen pH-Wert von 5,0 bis 7,0, besonders bevor-

zugt einen pH-Wert von ca. 5,6. Durch Mischung dieses Pufferkonzentrates mit einer definierten Menge des Harnstoffkonzentrates wird ein Anwendungspuffer mit höherem pH-Wert erzeugt. Gemäß einer Ausführungsform weist der Anwendungspuffer zum Waschen der Matrix und zum Lösen unspezifisch gebundener Proteine einen leicht sauren bis neutralen pH-Wert auf, bevorzugt einen pH-Wert von 5,5 bis 7,0, besonders bevorzugt einen pH-Wert von 6 bis 6,5.

**[0013]** Das Pufferkonzentrat, welches zur Herstellung des Anwendungspuffers zur Elution des Proteins eingesetzt wird, weist gemäß einer Ausführungsform einen sauren pH-Wert auf, bevorzugt einen pH-Wert weniger als 4, besonders bevorzugt einen pH-Wert von weniger als 3,5. Durch Mischung dieses Pufferkonzentrates mit einer definierten Menge des Harnstoffkonzentrates wird ein Anwendungspuffer mit höherem pH-Wert erzeugt. Gemäß einer Ausführungsform weist der Anwendungspuffer zur Elution des aufzureinigenden Proteins aus der Matrix einen sauren pH-Wert auf, bevorzugt einen pH-Wert von unter 5,5, besonders bevorzugt einen pH-Wert von unter 5 bspw. bei ca. 4,5.

**[0014]** Die pH-Werte dieser Pufferkonzentrate bleiben über lange Zeit stabil, wie aus [Fig. 3](#) zu ersehen ist. Ein wichtiger Grund für diese pH-Stabilität gegenüber den im Stand der Technik bekannten Pufferlösungen ist die Abwesenheit von störenden Mengen an Harnstoff in den Pufferkonzentraten. Die Anwendungspuffer erreichen durch die gezielte Mischung bestimmter Mengen an Pufferkonzentrat mit Harnstoffkonzentrat eine vorher bestimmbare, bzw. definierte Zusammensetzung und einen vorher bestimmbaren, bzw. definierten pH-Wert. Durch diese pH-Stabilität und Konstanz in der Zusammensetzung werden die Ergebnisse des Proteinaufreinigungsverfahrens reproduzierbar und qualitativ vergleichbar. Da der Anwender die Puffer nicht selbst ansetzen muss, werden Schwankungen in der Zusammensetzung vermieden. Die pH-Werte der aus den Konzentraten erzeugten Anwendungspuffer bleiben selbst bei langer Lagerung der Konzentrate konstant, wie es aus [Fig. 4](#) zu ersehen ist.

**[0015]** Die Pufferkonzentrate weisen vorzugsweise einen biologischen Puffer auf. Biologische Puffer werden in vielfältiger Form im Bereich der Biologie und Molekularbiologie eingesetzt. Im Unterschied zu klassischen, anorganischen puffernden Substanzen beeinflussen sie das zu untersuchende System nicht nachteilig. Biologische Puffer enthalten oftmals Zwitterionen. Eine Übersicht über biologische Puffer findet sich bspw. auf der Homepage von Sigma-Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

**[0016]** Gemäß einer Ausführungsform weist das Pufferkonzentrat zur Herstellung des Binde-Anwen-

dungspuffers einen Puffer auf, der eine Pufferkapazität im Alkalischen aufweist, vorzugsweise in einem Bereich von ca. 7,0 bis 9,0. HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), MES(2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), Natriumphosphat-, Citrat-, Succinat- oder Acetatpuffer seien hier als mögliche, erfindungsgemäß einsetzbare Puffer erwähnt. Bevorzugt werden aminhaltige Puffer eingesetzt. Ein bevorzugtes Beispiel für einen biologischen, aminhaltigen Puffer ist ein Tris-Puffer.

**[0017]** Gemäß einer Ausführungsform weisen die Pufferkonzentrate zur Herstellung des Wasch- und Elutions-Anwendungspuffers einen Puffer auf, der eine Pufferkapazität im Neutralen bis Sauren aufweist, vorzugsweise in einem Bereich von ca. 4,0 bis 7,5. Citrat-, Succinat- oder Acetatpuffer sind hier erfindungsgemäß geeignete Puffer. Ein besonders geeignetes Beispiel für einen biologischen Puffer ist Bis-Tris.

**[0018]** Die Pufferkonzentrate zur Herstellung des Waschpuffers und des Elutionspuffers können die gleiche Zusammensetzung aufweisen, wobei sie jedoch einen unterschiedlichen pH-Wert aufweisen. Der pH-Wert des Waschkonzentrates ist höher als der des Elutionskonzentrates.

**[0019]** Gemäß einer Ausführungsform weisen die Pufferkonzentrate ferner Salze, beispielsweise NaCl, KCl oder  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , vorzugsweise  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und/oder nicht-ionische Tenside, beispielsweise Triton X100, Triton X114, NP-40, CHAPS, DDM, b-OG, NG, Brij35 oder Digitonin, oder vorzugsweise Tween auf. Gemäß einer Ausführungsform weisen die Pufferkonzentrate zusätzlich ein Konservierungsmittel, vorzugsweise  $\text{Na-N}_3$ , auf.

**[0020]** Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält das zur Herstellung des Anwendungspuffers verwendete Pufferkonzentrat 25–500 mM, vorzugsweise 50–300 mM, besonders bevorzugt 100–250 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (insbesondere zur Herstellung des Bindepuffers) oder BisTris(Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (insbesondere zur Herstellung des Wasch- bzw. Elutionspuffers), sowie zusätzlich 125–750 mM, vorzugsweise 250 bis 500 mM, besonders bevorzugt 300–450 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und/oder 0,025 bis 0,5% (v/v), vorzugsweise 0,05–0,3% (v/v), besonders bevorzugt 0,1 bis 0,25% (v/v) nichtionische Tenside und/oder 0,0025 bis 0,05%, vorzugsweise 0,005–0,03%, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,025%  $\text{NaN}_3$ . Bevorzugt wird Tris(hydroxymethyl)-aminomethan oder BisTris(Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan in Form von Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid oder BisTris(Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methanchlorid eingesetzt.

**[0021]** Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das zur Herstellung des Anwendungspuffers separat bereitgestellte Harnstoffkonzentrat eine wässrige Lösung mit 8 bis 10 M Harnstoff; gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Harnstoffkonzentrat eine wässrige Lösung mit 9,3 bis 9,8 M Harnstoff, vorzugsweise 9,6 M Harnstoff.

**[0022]** Gemäß einer Ausführungsform wird ein Teil Pufferkonzentrat mit 3,7 Teilen Harnstoffkonzentrat gemischt, um einen erfindungsgemäßen Anwendungspuffer zu erhalten. Gemäß einer Ausführungsform wird dieses Mischungsverhältnis auf die Herstellung aller Anwendungspuffer angewandt.

**[0023]** Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines Harnstoffkonzentrats zur Herstellung eines Anwendungspuffers mit definiertem pH-Wert, wobei eine definierte Menge eines Harnstoffkonzentrats mit einer definierten Menge eines Pufferkonzentrats gemischt wird. Durch die separate Bereitstellung des Harnstoffkonzentrats und seine Mischung mit dem Pufferkonzentrat kurz vor der Anwendung werden Anwendungspuffer erzielt, welche nicht nur eine definierte Zusammensetzung, sondern auch einen bestimmten, vorher definierten pH-Wert aufweisen. Dies trägt zu besseren und vor allem standardisierbaren Bedingungen in der Proteinaufreinigung bei. Einzelheiten zu den Vorteilen, der Zusammensetzung der Harnstoff- und Pufferkonzentrate wurden oben im Detail erläutert. Wir verweisen auf unsere obige Offenbarung, die auch im Zusammenhang mit der Verwendung gilt.

**[0024]** Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird ferner ein Kit zur Aufreinigung von Proteinen über IMAC unter denaturierenden Bedingungen bereitgestellt, welches mindestens ein Pufferkonzentrat mit definiertem pH-Wert und ein Harnstoffkonzentrat zur Herstellung wenigstens eines Anwendungspuffers mit definiertem pH-Wert aufweist.

**[0025]** Gemäß einer Ausführungsform weist das Kit wenigstens drei Pufferkonzentrate mit jeweils unterschiedlichem, definiertem pH-Wert auf, die durch Mischung mit jeweils einer definierten Menge an Harnstoffkonzentrat zu wenigstens drei verschiedenen Anwendungspuffer mit definierter Zusammensetzung und definiertem pH-Wert führen.

**[0026]** Das erfindungsgemäße Kit ist aufgrund der separat bereitgestellten Konzentrate stabil und damit in vorteilhafter Weise lagerungsfähig. Durch die wenigen und direkt einsatzfähigen Komponenten ist das Kit übersichtlich gestaltet und für den Anwender sicher und schnell einsetzbar. Es sind keine Einstellungen der Pufferbedingungen durch den Anwender erforderlich, wodurch reproduzierbare und qualitativ gleichbleibende Ergebnisse erzeugt werden. Auch

kann das Kit durch weniger geschultes Personal eingesetzt werden, da die Fehleranfälligkeit reduziert ist. Es ist dadurch besonders für einen hohen Probenumsatz geeignet. Ferner kann das Kit in Kombination mit automatisierten Verfahren eingesetzt werden.

**[0027]** Das Kit kann auch ein Puffersystem zur Aufreinigung von Proteinen über IMAC unter denaturierenden Bedingungen darstellen, welches mindestens ein Pufferkonzentrat mit definiertem pH-Wert und ein Harnstoffkonzentrat aufweist, welches durch Mischung mit dem Pufferkonzentrat zu einem Anwendungspuffer mit definiertem pH-Wert führt.

**[0028]** Einzelheiten zu den Pufferkonzentraten, dem Harnstoffkonzentrat sowie den daraus erzeugten Anwendungspuffern sind oben im Detail beschrieben. Wir verweisen auf unsere obigen Ausführungen, die auch im Zusammenhang mit dem Kit gelten und Bestandteile der entsprechenden Offenbarung sind.

**[0029]** Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits enthält das zur Herstellung des Anwendungspuffers verwendete Pufferkonzentrat 25–500 mM, vorzugsweise 50–300 mM, besonders bevorzugt 100–250 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (insbesondere zur Herstellung des Bindepuffers) oder BisTris(Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (insbesondere zur Herstellung des Wasch- bzw. Elutionspuffers), sowie zusätzlich 125–750 mM, vorzugsweise 250 bis 500 mM, besonders bevorzugt 300–450 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und/oder 0,025 bis 0,5% (v/v), vorzugsweise 0,05–0,3% (v/v), besonders bevorzugt 0,1 bis 0,25% (v/v) nichtionische Tenside und/oder 0,0025 bis 0,05%, vorzugsweise 0,005–0,03%, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,025%  $\text{NaN}_3$ . Bevorzugt wird Tris(hydroxymethyl)-aminomethan oder BisTris(Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan in Form von Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid oder BisTris(Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methanchlorid eingesetzt.

**[0030]** Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen ist das Harnstoffkonzentrat eine wässrige Lösung mit 8 bis 10 M Harnstoff; gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Harnstoffkonzentrat eine wässrige Lösung mit 9,3 bis 9,8 M Harnstoff, vorzugsweise 9,6 M Harnstoff.

**[0031]** Gemäß einer Ausführungsform verändern die Kitkomponenten (Pufferkonzentrat(e), Harnstoffkonzentrat) ihren pH-Wert für wenigstens 100, vorzugsweise wenigstens 150 Tage um nicht mehr als  $\pm 0,5$  vorzugsweise um  $\pm 0,3$  bzw.  $\pm 0,1$ . Sie sind daher lagerungsfähig und als geschlossenes Kit-Konzept einsetzbar.

**[0032]** Die lagerungsfähigen Kitkomponenten erzeugen vorzugsweise nach einer Lagerungsdauer von wenigstens 100, vorzugsweise 150 Tagen bei Mischung der Pufferkonzentrate mit dem Harnstoffkonzentrat Anwendungspuffer mit definiertem pH-Wert  $\pm 0,5$ .

**[0033]** Das Kit kann ferner eine MAC Matrix aufweisen, vorzugsweise eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Matrix. Diese kann auch in Form von Beads, insbesondere magnetischen Partikeln, bereitgestellt werden.

## FIGUREN

**[0034]** **Fig. 1:** Demonstriert sind die Probleme der fehlenden pH-Stabilität von im Stand der Technik bekannten Puffersystemen, die standardmäßig zur denaturierenden Aufreinigung von  $6 \times \text{His}$ -getaggten Proteine eingesetzt werden. Folgende Pufferzusammensetzungen wurden für den Binde-, Wasch- und Elutionspuffer (Anwendungspuffer) genutzt.

**[0035]** 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff und 0,05% Tween 20. Der pH-Wert des Binde-Puffers (Buffer B-T) wurde auf pH 8,0, der des Waschpuffers (Buffer C-T) auf pH 6,3 und der des Elutions-Puffers (Buffer E-T) auf pH 4,5 eingestellt. Wie **Fig. 1a** bis c) zeigt, steigt der pH-Wert der einzelnen Pufferlösungen bereits nach wenigen Tagen linear an.

**[0036]** **Fig. 1a** zeigt die Entwicklung des pH-Wertes für eine harnstoffhaltige Binde-Pufferlösung „Buffer B-T“ zur Bindung des Proteins an die Matrix. Wie in der Grafik deutlich sichtbar ist, steigt der zunächst auf pH 8,0 eingestellte pH-Wert der Pufferlösung nach wenigen Tagen linear an und erreicht nach ca. zwei Monaten einen pH-Wert von 8,4.

**[0037]** **Fig. 1b** zeigt die Entwicklung des pH-Wertes für einen harnstoffhaltigen Anwendungspuffer „Buffer C-T“ zum Waschen und Lösen unspezifisch gebundener Proteine aus der Matrix. Wie in der Grafik deutlich sichtbar ist, steigt der zunächst auf pH 6,3 eingestellte pH-Wert der Pufferlösung schon nach wenigen Tagen linear an und erreicht nach ca. zwei Monaten bereits einen neutralen pH-Wert von 7. Ein effizientes Waschen der Matrix ist unter diesen Bedingungen nicht mehr gegeben, der pH-Wert muss neu eingestellt werden.

**[0038]** **Fig. 1c** zeigt Entwicklung des pH-Wertes für einen harnstoffhaltigen Anwendungspuffer „Buffer E-T“ zur Elution der interessierenden Proteine aus der Matrix. Wie in der Grafik deutlich sichtbar ist, steigt der zunächst auf pH 4,5 eingestellte pH-Wert der Pufferlösung schon nach wenigen Tagen linear an und erreicht nach ca. zwei Monaten bereits einen pH-Wert von über 6,5. Hier ist keine effiziente Elution des Proteins mehr möglich, der pH-Wert muss neu



eingestellt werden.

**[0039]** Durch den pH-Anstieg ist die Bindung des Proteins an die Matrix nicht mehr optimal; zudem leidet die Stringenz der Waschschritte und die Elutions-effizienz ist herabgesetzt. Beim Einsatz dieser Puffer über längere Zeit wäre eine regelmäßige pH-Korrektur notwendig.

**[0040]** **Fig. 2:** Der Anstieg der pH-Werte der harnstoffhaltigen Pufferlösungen könnte auf der hier dargestellten Reaktionsabfolge beruhen. Harnstoff könnte mit Tris zu einer Übergangsverbindung reagieren, aus der sich dann Ammoniak, eine starke Base abspaltet. Durch die Entstehung von Ammoniak ändert sich dann der pH-Wert der Pufferlösung schnell zum Basischen hin. Durch die Reaktion des Harnstoffs mit Tris gehen ferner Trismoleküle verloren, die dann nicht mehr für eine puffernde Wirkung zu Verfügung stehen.

**[0041]** **Fig. 3:** Demonstriert wird die pH-Wert Stabilität der erfindungsgemäßen Pufferkonzentrate über die Zeit. Es wurden acht pH-Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Folgende Zusammensetzungen wurden für die Pufferkonzentrate gewählt: 370 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 185 mM TrisCl, 0,185% (v/v) Tween 20, 0,02%  $\text{NaN}_3$  für das Binde-Pufferkonzentrat; 370 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 185 mM Bis-TrisCl, 0,185% (v/v) Tween 20, 0,02%  $\text{NaN}_3$  für das Wasch- und das Binde-Pufferkonzentrat.

**[0042]** Das auf pH 7,5 voreingestellte Binde-Pufferkonzentrat (hier NTT-7.5) behält seinen pH-Wert ohne Schwankungen auch noch nach mehr als 100 Tagen bei. Das auf pH 5,6 voreingestellte Wasch-Pufferkonzentrat (hier NTT-5.6) behält seinen pH-Wert ebenfalls ohne Schwankungen oder nennenswerte Änderungen des pH-Wertes auch noch nach mehr als 100 Tagen bei. Das auf pH 3,0 voreingestellte Binde-Pufferkonzentrat (hier NTT-3.0) behält seinen pH-Wert ohne nennenswerte Schwankungen auch noch nach mehr als 100 Tagen bei. Dieser Versuch belegt die pH-Stabilität der erfindungsgemäß eingesetzten Konzentrate, wodurch diese aufgrund ihrer Lager-Stabilität auch in geschlossenen Kit-Systemen zum Einsatz kommen können.

**[0043]** **Fig. 4:** Gezeigt ist ein Beispiel für die pH-Stabilität der erfindungsgemäß aus den Konzentraten (Pufferkonzentrat und Harnstoffkonzentrat) hergestellten Anwendungspuffer (BP = Bindepuffer; WP = Waschpuffer; EP = Elutionspuffer). Für die Herstellung der Anwendungspuffer wurden die Pufferkonzentrate mit den in **Fig. 3** beschriebenen Zusammensetzungen und pH-Werten gewählt. Das Harnstoffkonzentrat bestand aus einer wässrigen 9,6 M Harnstofflösung, wodurch die fertigen Anwendungspuffer 7,0 M Harnstoff aufwiesen.

**[0044]** Der Anwendungspuffer zur Bindung (pH 8,0) entsteht durch Mischen einer definierten Menge an Binde-Pufferkonzentrat mit pH 7,5 (siehe oben) mit dem Harnstoffkonzentrat. Der Anwendungspuffer zum Waschen (pH 6,3) entsteht durch die Mischung des Wasch-Pufferkonzentrats (siehe oben) mit dem Harnstoffkonzentrat. Die Anwendungspuffer wurden jeweils vor der Messung aus den gelagerten Konzentraten (Pufferkonzentrat und Harnstoffkonzentrat) gemischt. Die aus den Konzentraten erzeugten Anwendungspuffer zur Bindung und zum Waschen zeigen keine nennenswerte pH-Wert Änderung bis zum 150. Tag. Entsprechendes gilt für den Elutionspuffer.

**[0045]** Der Anwendungspuffer zur Elution (pH 4,5) entsteht durch Mischen einer definierten Menge an Pufferkonzentrat mit pH 3,0 (siehe oben) mit dem Harnstoffkonzentrat. Über einen Mess-Zeitraum von mehr als 250 Tagen zeigt das Elutions-Pufferkonzentrat nur einen geringen, tolerierbaren Anstieg des pH-Wertes von 4,5 auf ca. 4,9. Dies zeigt, dass auch nach längerer Lagerung aus den einzelnen Konzentraten durch einfache Mischung Anwendungspuffer mit definierter Zusammensetzung und definiertem, gewünschtem pH-Wert erzielt werden. Die Vorteile wurden oben ausführlich dargelegt.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Hochuli et al. 1988 [0002]
- www.sigmaaldrich.com [0015]

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Anwendungspuffers zur Aufreinigung von Proteinen über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine definierte Menge eines Pufferkonzentrates mit definiertem pH-Wert mit einer definierten Menge eines Harnstoffkonzentrates gemischt wird, wodurch ein Anwendungspuffer mit definiertem pH-Wert bereitgestellt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens drei Pufferkonzentrate mit jeweils unterschiedlichem pH-Wert mit einer definierten Menge eines Harnstoffkonzentrates gemischt werden, wodurch drei Anwendungspuffer mit jeweils unterschiedlichem, definiertem pH-Wert bereitgestellt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der folgenden Merkmale:

- a. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Bindung ist, einen alkalischen pH-Wert aufweist; und/oder
- b. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Bindung ist, einen pH-Wert von 7,0 bis 9,0 aufweist; und/oder
- c. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Bindung ist, einen pH-Wert von ca. 7,5 aufweist; und/oder
- d. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zum Waschen ist, einen leicht sauren pH-Wert aufweist; und/oder
- e. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zum Waschen ist, einen pH-Wert von 5,5 bis 7,0 aufweist; und/oder
- f. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zum Waschen ist, einen pH-Wert von ca. 5,6 aufweist; und/oder
- g. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Elution ist, einen sauren pH-Wert aufweist; und/oder
- h. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Elution ist, einen pH-Wert von unter 4, vorzugsweise unter 3,5 aufweist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der folgenden Merkmale

- a. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates

mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zur Bindung einen alkalischen pH-Wert aufweist; und/oder

- b. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zur Bindung einen pH-Wert von 7,0 bis 9,0 aufweist; und/oder

- c. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zur Bindung einen pH-Wert von ca. 8 aufweist; und/oder

- d. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zum Waschen einen leicht sauren bis neutralen pH-Wert aufweist; und/oder

- e. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zum Waschen einen pH-Wert von 5,5 bis 9,0 aufweist; und/oder

- f. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zum Waschen einen pH-Wert von 6 bis 6,5 aufweist; und/oder

- g. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zur Elution einen sauren pH-Wert aufweist; und/oder

- h. dass der durch Mischung des Pufferkonzentrates mit dem Harnstoffkonzentrat erzeugte Anwendungspuffer zur Elution einen pH-Wert von unter 5,5, vorzugsweise unter 5 aufweist.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Pufferkonzentrat mit definiertem pH-Wert einen biologischen Puffer aufweist.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,

- a. dass das Pufferkonzentrat zur Herstellung des Binde-Anwendungspuffer einen Puffer aufweist, der eine Pufferkapazität im Alkalischen aufweist, vorzugsweise Tris; und

- b. dass die Pufferkonzentrate zur Herstellung des Wasch- und Anwendungspuffers einen Puffer aufweist, der eine Pufferkapazität im Neutralen bis Sauren aufweist, vorzugsweise Bis-Tris; und/oder

- c. dass die Pufferkonzentrate Salze, vorzugsweise  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und/oder Detergenzien, vorzugsweise Tween und/oder ein Konservierungsmittel, vorzugsweise  $\text{NaN}_3$  aufweisen.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Harnstoffkonzentrat eine wässrige Lösung mit 8 bis 10 M, vorzugsweise 9,3 bis 9,8 M Harnstoff eingesetzt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Puf-



ferkonzentrat und das Harnstoffkonzentrat im Verhältnis 1 zu 3,7 gemischt werden.

9. Verwendung eines Harnstoffkonzentrates zur Herstellung eines Anwendungspuffers mit definiertem pH-Wert, wobei eine definierte Menge eines Harnstoffkonzentrats mit einer definierten Menge eines Pufferkonzentrats mit voreingestelltem pH-Wert gemischt wird.

10. Kit zur Aufreinigung von Proteinen über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen, enthaltend wenigstens ein Pufferkonzentrat mit definiertem pH-Wert, sowie wenigstens ein Harnstoffkonzentrat zur Herstellung eines Anwendungspuffers mit definiertem pH-Wert.

11. Kit nach Anspruch 10, enthaltend wenigstens drei Pufferkonzentrate mit unterschiedlichem, definierten pH-Wert, sowie ein Harnstoffkonzentrat zur Herstellung von wenigstens drei Anwendungspuffer mit jeweils unterschiedlichem, definiertem pH-Wert.

12. Kit nach Anspruch 10 oder 11, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der folgenden Merkmale:

- a. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Bindung ist, einen alkalischen pH-Wert aufweist; und/oder
- b. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Bindung ist, einen pH-Wert von 7,0 bis 9,0 aufweist; und/oder
- c. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Bindung ist, einen pH-Wert von ca. 7,5 aufweist; und/oder
- d. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zum Waschen ist, einen leicht sauren bis neutralen pH-Wert aufweist; und/oder
- e. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zum Waschen ist, einen pH-Wert von 5,5 bis 7,0 aufweist; und/oder
- f. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zum Waschen ist, einen pH-Wert von ca. 5,6 aufweist; und/oder
- g. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Elution ist, einen sauren pH-Wert aufweist; und/oder
- h. dass das Pufferkonzentrat, welches nach Mischung mit dem Harnstoffkonzentrat ein Anwendungspuffer zur Elution ist, einen pH-Wert von unter 4, vorzugsweise unter 3,5 aufweist.

13. Kit nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Pufferkonzentrat mit definiertem pH-Wert einen biologischen Puffer aufweist.

14. Kit nach einem der oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet,

- a. dass das Pufferkonzentrat zur Herstellung des Binde-Anwendungspuffer einen Puffer aufweist, der eine Pufferkapazität im Alkalischen aufweist, vorzugsweise Tris; und
- b. dass die Pufferkonzentrate zur Herstellung des Wasch- und Anwendungspuffers einen Puffer aufweisen, der eine Pufferkapazität im Neutralen bis Sauren aufweist, vorzugsweise Bis-Tris; und/oder
- c. dass die Pufferkonzentrate Salze, vorzugsweise  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , und/oder Detergenzien, vorzugsweise Tween und/oder ein Konservierungsmittel, vorzugsweise  $\text{NaN}_3$  aufweisen.

15. Kit nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Puffersystem ist.

16. Kit nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der folgenden Merkmale:

- a. die Kitkomponenten verändern ihren pH-Wert für wenigstens 100, vorzugsweise wenigstens 150 Tage nicht um mehr als  $\pm 0,1$ ; und/oder
- b. die Kitkomponenten erzeugen nach einer Lagerungsdauer von wenigstens 100, vorzugsweise 150 Tage bei Mischung der Pufferkonzentrate mit dem Harnstoffkonzentrat Anwendungspuffer mit definiertem pH-Wert  $\pm 0,5$ ; und/oder
- c. das Kit weist eine Matrix, vorzugsweise IMAC, vorzugsweise  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA auf; und/oder
- d. das Kit ist für die automatisierte Anwendung einsetzbar.

17. Kit nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Kit eine IMAC Matrix aufweist, vorzugsweise in Form von magnetischen Partikeln.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1a

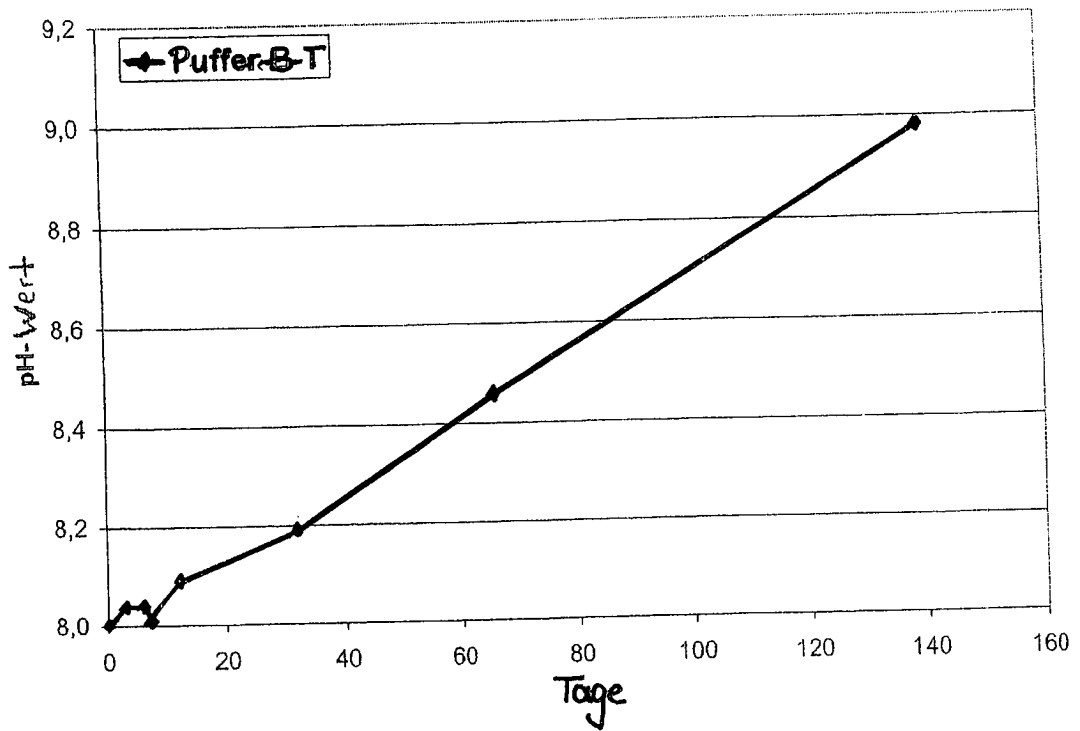


Fig. 1b

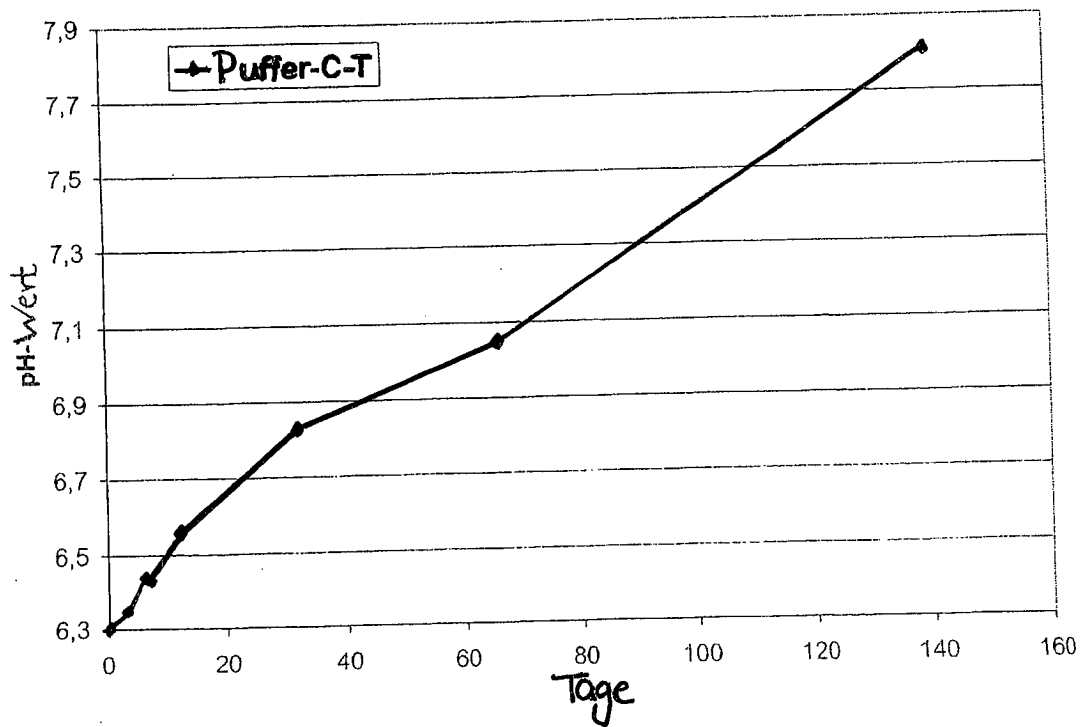


Fig. 1c

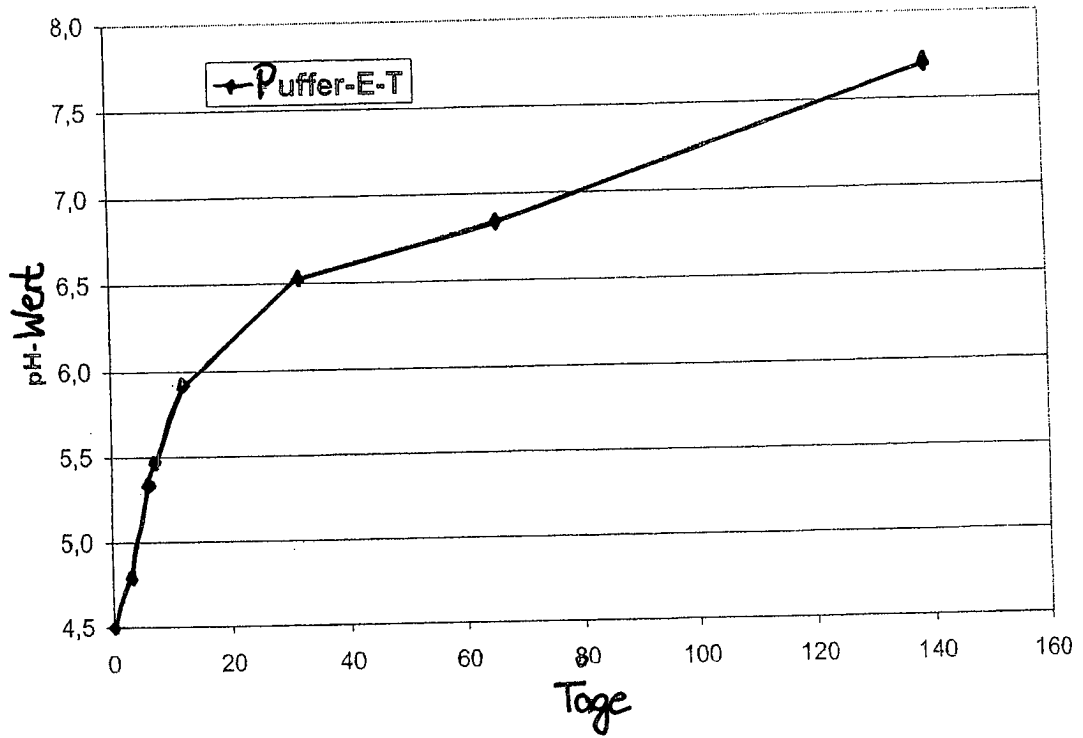


Fig. 2

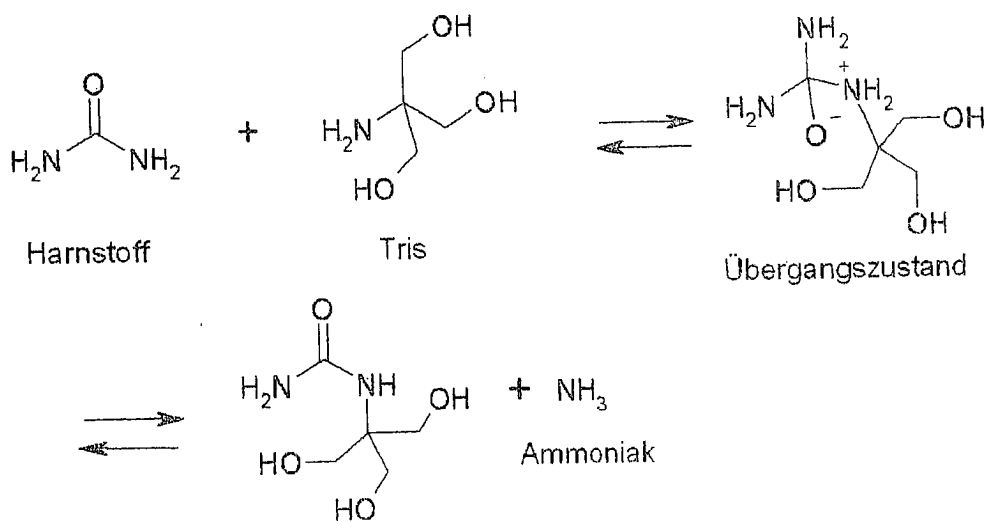


Fig. 3

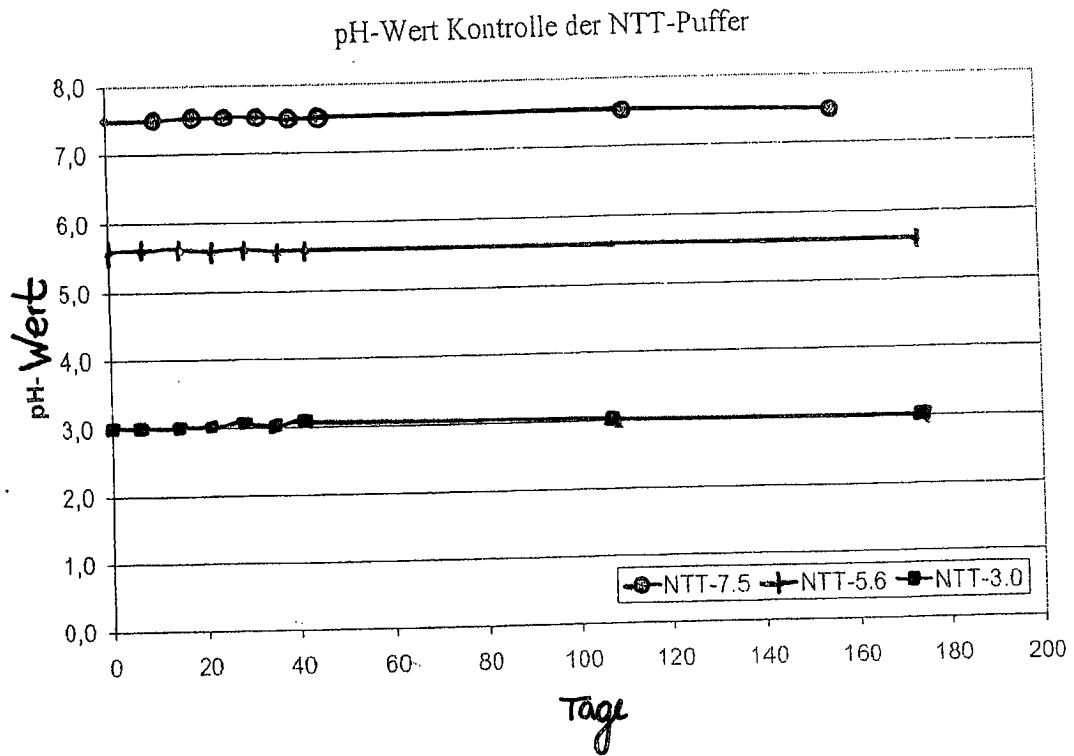


Fig. 4

