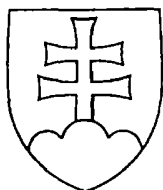


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

(11), (21) Číslo dokumentu:

859-2002

- (22) Dátum podania prihlášky: **14. 6. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **BO2001A000426**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **6. 7. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IT**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **9. 1. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **1/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷:

C07K 1/18

- (71) Prihlasovateľ: **ALFA WASSERMANN S. p. A., Alanno Scalo (Pescara), IT;**
(72) Pôvodca: **Scapol Lucia, Sasso Marconi (Bologna), IT;**
Viscomi Giuseppe Claudio, Sasso Marconi (Bologna), IT;
(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob čistenia farmakologicky účinných proteínov**

(57) Anotácia:

Je opísaný spôsob čistenia farmakologicky účinných proteínov založený na použití katexovej chromatografie na tuhej matrici, ktorý sa uskutočňuje pri zásaditejšom pH, ako je zodpovedajúci izoelektrický bod pI čistených proteínov, pričom pri tomto pH sú proteíny ešte stále absorbované. Na dosiahnutie požadovaného výsledku sa používajú tlmivé roztoky s hodnotami pH a iónovou silou, ktoré sa upravujú v čase a v závislosti od druhu čisteného farmakologicky účinného proteínu. Spôsob je určený najmä pre interferón a albumínové proteíny.

Spôsob čistenia farmakologicky účinných proteínov

Oblasť techniky

Predmetom vynálezu je spôsob čistenia farmakologicky účinných proteínov založený na použití katexovej chromatografie na tuhej matrici uskutočňovaný pri zásaditejšom pH t.j. vyššom vzhľadom ako je pH zodpovedajúce izoelektrickému bodu pi čistených proteínov, pričom ale pri tomto pH zostávajú tieto proteíny absorbované.

Na tento účel sa používajú tlmivé roztoky s hodnotou pH a iónovou silou, ktoré sa menia v závislosti od času a druhu farmakologicky účinných proteínov, ktoré sa majú čistiť.

Spôsob je smerovaný najmä k čisteniu interferónových a albumínových proteínov.

Doterajší stav techniky

Široká oblasť biomedicínskych vied je založená na použití farmakologicky účinných proteínov prírodného pôvodu, ktoré sa získali extrakčnými technikami, ako aj syntetického pôvodu, ktoré sa získali pomocou techník rekombinantnej DNA. Úroveň čistoty produktov záujmu je významná v oboch prípadoch, pretože ich účinnosť určená možnosťou presného spojenia biologického účinku s prítomnosťou viazaného množstva proteínu.

V tomto kontexte čistenie farmakologicky účinných proteínov predstavuje významnú časť, pretože čistota získaných proteínov má značný význam pri prítomnosti účinných látok alebo excipientov v medicínálnych výrobkoch. Možnosť zapríčinenia toxických účinkov a/alebo nepriaznivých vedľajších účinkov počas liečenia tlačí inštitúcie zodpovedné za registráciu a certifikáciu predaja liekov založených na proteínoch k zavádzaniu prísnejších pravidiel na stanovenie kvality a výroby jednotnejších účinných látok proteínového pôvodu, ktoré sú obsiahnuté v predávaných liekoch.

Z vyššie uvedeného je zrejmý význam čistenia proteínov, v ktorom hlavný problém spočíva v skutočnosti, že farmakologicky

účinné proteíny sú vždy v zložených zmesiach spoločne s mnohými inými proteínmi.

Táto skutočnosť sa týka prírodných zdrojov používaných na extrakciu farmakologicky účinných proteínov, ako je napríklad krv, extrakty z orgánov zvierat alebo rastlín ako aj použitých techník rekombinantnej DNA, pretože proteíny vykazujú podobné fyzikálno-chemické vlastnosti medzi sebou nezávisle od zdroja ich pôvodu.

Z vyššie uvedeného vyplýva, že v prípade čistení farmakologicky účinných proteínov, je proteín zmiešaný s inými proteínmi s podobnými vlastnosťami a často výrazne prevyšujúcimi množstvo želaného proteínu, ktorý sa má izolovať s vysokým stupňom čistoty.

Úlohou je spresnenie niekoľkých krokov čistenia, ktoré sa bežne používajú na získanie potrebných úrovní čistoty. Čistiace procesy sa takto stali komplexnými a úspech priemyselnej výroby proteínu je v podstate spojený s účinnosťou čistiaceho procesu, pretože táto požiadavka určuje náklady na výrobu.

Na čistenie proteínov sa používajú mnohé techniky ako napríklad selektívne zrážanie vo vodných a organických rozpúšťadlách alebo s kaotrópnymi činidlami, separácie pomocou filtrácie a/alebo dialýzy, procesy imuno-zrážania vo vhodných protilátkach, chromatografické procesy. Tieto ostatné procesy nadobudli v posledných rokoch veľký význam, pretože umožňujú dosiahnuť požadované stupne čistoty ako je zrejme z článku Regniera F. E. v J. Chromatogr. 418, 115-143, (1987).

Mnohé techniky sú uvedené vo vedeckej literatúre a môžu sa roztriediť na základe mechanizmu pôsobenia aplikovaného pri separácii proteínov ako napr. separácia na základe molekulovej hmotnosti, absorpcia na polárnych matriciach, ktoré sa tiež uvádzajú ako normálne stacionárne fázy, absorpcia na nepolárnych matriciach, ktoré sa tiež nazývajú obrátené stacionárne fázy, absorpcia pomocou selektívnej afinity k ligandom naviazaným na inertné matrice, ako sú ťažké kovy ako meď, zinok, železo a platina, chemické farbivá ako je briliantová modrá, proteíny ako proteín A a proteín G, uhľovodíky ako sú polysacharidy a glukózaminoglykány, absorpcia

pomocou imuno-afinity so špecifickými protilátkami naviazanými na inertných matriciach, absorpcia iónovou interakciou s elektrostaticky nabitými ligandami naviazanými na inertné matrice.

Selektivita t.j. schopnosť selektívne rozpoznať želaný proteín, náklady a možnosť použitia na priemyselnej úrovni sú parametre používané na vyjadrenie prevádzky rôznych chromatografických techník.

Na základe týchto parametrov sa imuno-afinitná chromatografia považuje že, zaručuje väčšiu selektívnosť, ale tiež vykazuje nedostatky ako je vysoká cena pri použití, nebezpečenstvo denaturácie protilátky a nebezpečenstvo spojené s bezpečnosťou čisteného produktu, pretože protilátka je živočíšneho pôvodu.

Chromatografia, ktorá používa iónovú interakciu sa tiež nazýva ionexovou chromatografiou a je považovaná za menej riskantnú techniku na udržanie farmakologickej aktivity proteínov a ľahšie sa uskutočňuje v priemyselnom merítku s nižšími nákladmi uskutočnenia, ale vykazuje nedostatok spočívajúci v nižšej selektivite.

Preto by bolo výhodné nájsť podmienky vykonávania ionexovej chromatografie so zvýšenou selektivitou, ktorá by umožnila jej vyrovnanie s ostatnými technikami z hľadiska čistoty získaného produktu.

Ionexová chromatografia sa zvyčajne uskutočňuje s použitím kolón rôznych veľkostí, plnených s tuhými matricami s chemickými skupinami, ktoré sú trvalo alebo v zvláštnych podmienkach elektrostaticky nabité.

Zlúčenina vložená do ionexovej kolóny interaguje prostredníctvom elektrostatického vzájomného pôsobenia/odpuzdovania s nábojmi naviazanými na matricu. Rôzne zlúčeniny obsiahnuté v zmesi sú schopné samotné sa viazať na stacionárnu fázu ako funkcia množstva získaného náboja a následne budú viac alebo menej zadržané, čím sa určí ich separácia na výstupe z kolóny.

Chromatografia sa nazýva katexovou chromatografiou, keď sú náboje matrice negatívne, pretože sa zadržávajú katióny, zatiaľ čo o anexovú chromatografiu ide, ak náboje matrice sú pozitívne.

Proteíny sú zlúčeniny majúce vysokú molekulovú hmotnosť, vyššiu ako 10 000 Daltonov zložené z heterogénnych polymérov aminokyselín, niektoré aminokyseliny majú vo svojom vedľajšom reťazci funkčné skupiny, ktoré sa môžu ionizovať negatívnym spôsobom ako funkcia pH roztoku, ako sú kyslé aminokyseliny, alebo pozitívnym spôsobom, ako sú zásadité aminokyseliny, a preto všetky proteíny majú vysoké množstvo negatívnych a pozitívnych nábojov. Izoelektrický bod pI proteínu je pH, pri ktorom je proteín neutrálny, pretože príspevok negatívnych nábojov je rovný príspevku pozitívnych nábojov, proteín v prostredí elektrického poľa nie je priťahovaný ani jednou z polarít elektrického poľa.

Množstvo negatívnych nábojov vzrastá pri pH vyššom ako pI a proteín dosahuje sieťový negatívny náboj, zatiaľ čo opak nastáva pri pH nižšom ako pI a proteín získava pozitívny sieťový náboj. Každý proteín má svoje vlastné charakteristické pI, ktoré ho odlišuje od ostatných a niektoré proteíny majú tendenciu byť nerozpustnými pri izoelektrickom bode.

Keď je proteín v roztoku pri pH nižšom ako pI má pozitívny sieťový náboj a preto môže interagovať s negatívne nabitou maticou a môže sa podrobiť katexovej chromatografii, zatiaľ čo sa môže proteín podrobiť anexovej chromatografii pri pH vyššom ako jeho pI, ako je uvedené v článku F.E. Regniera, Science, 238, 319-323, (1987) a z článku Yamamota S. a kol., Chromatographic Science Series, 43, (1988), Marcel Dekker, Inc. Publisher, New York.

Oproti vyššie uvedenému sa neočakávane zistilo a na tejto skutočnosti je založený samotný predmet tohto vynálezu, že je možné nájsť rozsah hodnôt pH, ktoré sú vyššie ako zodpovedajúce pI proteínu, ktoré je také, že proteíny ešte stále zostávajú absorbované na maticiach katexovej chromatografie, takže je stále možné uskutočniť katexovú chromatografiu. Takýto stav je zvlášť výhodný, pretože vysoká selektivita medzi proteínmi sa

dosahuje v týchto podmienkach, pretože veľmi malé rozdiely v pI medzi proteínmi sa stávajú dostatočné na získanie významných separácií, čím sa dosahuje vysoká účinnosť čistenia.

Tento posledný aspekt je najmä významný v čistiacich procesoch rekombinantných proteínov, kde je želaný produkt často sprevádzaný príbuznými nečistotami, t.j. obsahujú veľmi malé štruktúrne zmeny produktu, ako napríklad rôzne oxidačné stavy, acetylácie, strata amidových funkcií atď. Tento druh nečistôt je veľmi ťažké odstrániť tiež prostredníctvom imunoafinitnej chromatografie, pretože vo väčšine prípadov nie je možné ich protilátky.

Mechanizmus, ktorý môže vysvetliť zistený jav, ktorý je založený na skutočnosti, že distribúcia nábojov pozdĺž vonkajšieho povrchu proteínov nie je jednotná tak, že ak je aj pH o niečo vyššie ako pI a proteín má celkový negatívny sieťový náboj, stále tu existujú niektoré pozitívne náboje umiestnené v molekule, ktoré môžu interagovať s negatívnou stacionárnou fázou.

Na uskutočnenie tohto mechanizmu je dôležité, aby nadbytok negatívnych nábojov nebol tak výrazný, v opačnom prípade by vytvorené elektrické polia z negatívnych nábojov boli tak vysoké, že by bránili interakcii celého proteínu s negatívne nabitou chromatografickou maticou.

Navyše je potrebné kontrolovať iónovú silu roztokov používaných ako eluenty, pretože vysoká iónová sila by mohla spôsobiť tienenie proteínu a tak brániť jeho interakcii so stacionárnou fázou.

Lamson G.P. a kol., Anal. Biochem., 11, 374-377, (1965) v článku potvrdzujúcom uvádza prípad proteínov ako je ľudský γ -globulín, ribonukleáza, hemoglobín, δ -chymotrypsín, globín a lyzozým, v ktorých pri malých zmenách pH, ale pri udržaní príliš vysokej iónovej sily danej 0,1 M fosforečnanovým roztokom, elúcia v katexových chromatografiách nastala pri pH takmer o 0,4 jednotiek nižšom ako je pI.

Vyššie uvedený princíp, na ktorom sa zakladá samotný vynález, nebol doteraz využitý na uskutočnenie účinného procesu čistenia proteínov.

Možnosť použitia rozdielov v izoelektrickom bode proteínov na optimalizáciu čistiacich procesov opísaných A.K. Kontturim a kol. v Acta Chem. Scand., 50 (2), 102-106, (1996) sa v skutočnosti týka konvenčného použitia ionexovej chromatografie, kde sa katexová chromatografia vždy uskutočňuje pri pH nižšom ako je izoelektrický bod, zatiaľ čo anexová chromatografia sa uskutočňuje pri pH vyššom ako je izoelektrický bod. Spôsob opísaný v predloženej patentovej prihláške je taký, že katexové chromatografie sa oproti tomu uskutočňujú pri pH vyššom ako je izoelektrický bod proteínu.

Spôsob opísaný v predloženej patentovej prihláške sa môže považovať za všeobecný ako je ukázané v uvedených príkladoch, ktoré uvádzajú jeho úspešné použitie na proteín prírodného pôvodu ako aj proteín pochádzajúci z rekombinantnej DNA. Rozdiel medzi proteínom a proteínom je vo veľkosti rozsahu pH, vyššieho ako pI, vhodného na čistenie potrebného proteínu. Skutočne napríklad ako bude ukázané v nasledujúcich príkladoch, taký rozsah je okolo 0,2 jednotiek pH v prípade interferónových proteínov, zatiaľ čo v prípade albumínu ide o jednu jednotku pH.

Použitie predloženého vynálezu na čistenie rekombinantného α interferónu (rIFN α), ktorého izoelektrický bod je 5,9 ako je uvedené v Thacher D. a Panayotatos N., Methods Enzymol. 119, 166-177, (1986), ukazuje ako je možné a výhodné čistiť ho výmenou katiónov pri pH 6,1. Navyše príklad uvádza ľudský sérový albumín, ktorého pI je 4,9 ako je uvedené Rylattom D.B. a kol., J. Chromatogr., 865, 145-153, (1999) a naznačuje ako je možné a výhodné čistiť ho katiónovou výmenou pri pH 6,0.

Výhody spôsobu, ktorý je predmetom vynálezu, sú výrazné v porovnaní s výsledkami spôsobov opísaných vo vedeckých publikáciách a/alebo patentoch týkajúcich sa čistenia α interferónu a ľudského sérového albumínu a ktoré zvyčajne vyžadujú využitie troch alebo niekoľkých po sebe idúcich spracovaní a skutočne sú veľmi nákladné a majú nižšie výťažky.

Thatcher D. a Panaoytatos N. opisujú čistenie ľudského rekombinantného α -interferónu rIFN- α 2, Methods Enzymol., 119, 166-177, (1986) cez päť po sebe idúcich spracovaní, a) katexová chromatografia, b) anexová chromatografia, c) afinitná chromatografia ťažkých kovov, d) spracovanie s nasýteným roztokom síranu amónneho, e) molekulová vylučovacia chromatografia.

Európsky patent 0108585 opisuje na čistenie interferónu následné použitie troch typov chromatografie a) imunoafinitnej, b) katexovej, c) molekulovej vylučovacej. Americký patent US 4765903 týkajúci sa čistenia interferónu opisuje následné použitie štyroch typov chromatografie a) imunoafinitnej s monoklonálnou protilátkou, b) obrátenou fázou, c) katexovou, d) molekulovou vylučovacou.

Európsky patent 0679718 opisuje spôsob výroby α interferónu, ktorý uvádza nasledujúce štyri chromatografické kroky a) kovovo-chelatačné, b) katexové, c) anexové, d) gélovú filtráciu.

Ďalšie publikácie a patenty opisujú tri alebo viacero spracovaní, ktoré sú potrebné na čistenie interferónových proteínov, napríklad americký patent US 4732683, medzinárodná patentová prihláška WO 8604067 a publikácia od Khana F.R. a Rai V.R., Bioprocess Technol., 7, 161-169, (1990).

Uvedené príklady pokrývajú väčšinu príslušných problémov spojených s čistením interferónu vo všeobecnosti a najmä α -interferónu. Ukazujú ako je jeho čistenie náročné a vyžaduje mnohé kroky. Navyše je potrebné podčiarknuť ako sa dosahujú vysoké úrovne čistenia najmä pomocou imunoafinitných chromatografií s použitím monoklonálnych protilátok myšieho pôvodu. Avšak prítomnosť takej chromatografickej techniky v procese priemyselnej výroby zameranej na výrobu aktívnych látok na farmaceutické použitie u ľudí zapríčiňuje nebezpečenstvo možných vírusových znečistení myšieho pôvodu kvôli prítomnosti možných imunogénnych fragmentov pochádzajúcich od myších imunoglobulínov v konečnom produkte a kvôli ťažkostiam s výberom chromatografických matric z priemyselného hľadiska.

Navyše zo stručne uvedených príkladov vyplýva, že katexová chromatografia sa široko využíva, ale niekedy nie ako jediná separačná technika, pretože jej realizácia je obmedzená vzhľadom na zvyšovanie úrovni čistoty.

Publikácie od Babu K.R. a kol., Appl. Microbiol. Biotechnol., 53 (6), 655-660, (2000) a Bouyona R. a kol., Biotechnologia Aplicada, 14, 189-192, (1997), opisujú spôsoby čistenia α -interferónu v jednom kroku prostredníctvom ionexovej chromatografie v solnom gradiente. Avšak v oboch prípadoch na získanie produktu s dostatočnou čistotou autori publikácií mohli izolovať iba niektoré z chromatografických frakcií, v ktorých bol obsiahnutý α -interferón, čím sa získali veľmi malé výťažky, až do 7,5% minima. Navyše opísané chromatografické čistiace procesy v solnom gradiente nie sú schopné priemyselného použitia.

Mnohé techniky chromatografického čistenia sú tiež opísané pre prípad ľudského albumínu a vychádzajú z albumínových prípravkov získaných frakcionáciou ľudského séra alebo pomocou techník rekombinantnej DNA, komplexných techník a zriedkavo prenesiteľných na priemyselnú úroveň, čo potvrdzuje, že problém účinného čistenia ľudského albumínu prírodného ako aj rekombinantného pôvodu stále existuje.

Americké patenty US 6150504 a 5521287 opisujú čistenie albumínu prostredníctvom ionexovej chromatografie a hydrofóbnej interakcie. Schéma čistenia opísaná v americkom patente US 6034221 uvádza čistenie albumínu prostredníctvom dvoch chromatografických krokov, jedným je ultrafiltračný proces a druhým dva ďalšie kroky chromatografického čistenia.

Menej bežné spôsoby čistenia albumínu, v ktorých sa používajú anexové chromatografie vo fluidnom lôžku alebo afinitné chromatografie interagujúce s komerčne dostupnými matricami ako je Streamline^R alebo napríklad s vhodne pripravenými časticami modifikovaného zirkónu alebo s emulziami perfluóruhlovodíkov, sú opísané v americkom patente US 5962649 a publikáciách od Sumi A. a kol., Bioseparation, 8 (1-5), 195-200, (1999), Mullick A. a Flickinger M.C., Biotechnol. Bioeng.,

65 (3), 282-290, (1999) a Mc Creath G.E. a kol., J. Chromatogr., 597 (1-2), 189-196, (1992).

Nakoniec sú opísané techniky čistenia albumínu na ťažkých kovoch Yangom L. a kol., Sheng Wu kung Cheng Hsueh Pao, 16 (1), 74-77, (2000) a afinitné techniky na matriciach, ku ktorým sú naviazané molekuly farbív ako napríklad Cibacron Ble F3G, sú opísané v Compagnini A. a kol., J. Chromatogr. A, 736 (1-2), 115, (1996).

Všetky tieto techniky ukazujú rôznym spôsobom problémy spojené s komplexným uskutočnením a vysokými nákladmi, pričom problém charakterizácie nových spôsobov čistenia farmakologicky účinných proteínov ľahko a účinne na priemyselnej úrovni a ekonomicky výhodne nie je vyriešený.

Nižšie opísaný vynález dáva odpoveď na tieto významné požiadavky poskytnutím spôsobu čistenia farmakologicky účinných proteínov ľahkou priemyselnou uskutočniteľnosťou a nízkymi nákladmi s významnými ekonomickými výhodami.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka spôsobu čistenia farmakologicky účinných proteínov založeného na použití katexovej chromatografie na tuhej matrici za zvláštnych podmienok, ktoré zahŕňajú po vložení vzorky kondicionáciu kolóny s eluentami s vhodným pH a iónovou silou tak, že je v kolóne rovnomerne prítomné zásaditejšie pH, t.j. vyššie ako zodpovedajúci izoelektrický bod pI farmakologicky účinných proteínov, pri ktorom sú proteíny ešte absorbované na tuhej matrici použitej v ionexovej chromatografii. Po kondicionačnej fáze sa farmakologicky účinné proteíny eluujú z kolóny zvýšením iónovej sily a/alebo pH eluentov.

Účinné uskutočnenie predloženého vynálezu vyžaduje určenie pravej kombinácie medzi použitou chromatografickou matricou, hodnotou pH vyššou ako pI a použitou iónovou silou v chromatografických eluentoch, pretože keď sa definuje chromatografická matrica, účinné čistenie sa získa vykonaním limitovaných variácií pH a /alebo iónovej sily často v rozmedzí

desatín pH jednotiek a/alebo variácií iónovej sily v rozmedzí niekoľkých stotín μS .

Môžu sa použiť všetky funkcionalizované tuhé matrice bežne používané ako stacionárne fázy, najmä silné katexy sú uprednostňované, keď je pI čisteného proteínu nižšie ako 6, zatiaľ čo stacionárne fázy so silným ako aj slabým katexom sa môžu bez výnimky pre proteíny s pI vyšším ako 6. Tieto stacionárne fázy môžu byť kremičitými alebo polymérnymi matricami funkcionalizovanými so sulfoskupinami alebo karboxylovými skupinami vo forme kyslých alebo zásaditých solí. Dostupné stacionárne fázy, ktoré sa môžu použiť, sú napríklad Source^R S (Pharmacia Biotech), Sepharose^R SP-Fast Flow, Sepharose^R SP-High Performance, Sp Sepharose^R XL (Pharmacia Biotech), Fractogel^R S (Merck, Darmstadt), Mustang^R S (Pall Corporate), CM Sepharose^R FF (Pharmacia Biotech), Dowex^R, Bio-Rad^R AG (Bio-Rad), Poros^R S (perSeptive Biosystems), Shodex^R-S, Toyopearl^R SP (Tosohass)

Rozsah pH hodnôt, pri ktorých sa vynález môže účinne uskutočniť je veľmi široký, v závislosti od izoelektrických bodov farmakologicky účinných proteínov, ktoré sa majú čistiť, a je medzi 2 a 11, výhodne medzi 4 a 8,5.

Rozšírenie rozsahu pH hodnôt vyšších ako je pI, v ktorom sa spôsob podľa vynálezu uskutočňuje, sa mení od pH hodnôt korešpondujúcich s pI farmakologicky účinných proteínov k jednej pH jednotke nad tento pI a vykazuje významné rozdiely medzi proteínmi.

Napríklad sa zistilo, že v prípade rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b) je možné získať absorpciu proteínu na katexovej matrici až do 0,2 jednotiek pH nad jeho pI 5,9 a preto je možné uskutočniť jeho čistenie pomocou katexovej chromatografie, zatiaľ čo v prípade ľudského sérového albumínu sa zistilo, že zostáva absorbovaný do jednej pH jednotky nad svoj pI.

Rozsah koncentrácií solí vodných roztokov, ktoré sú použiteľné ako eluenty, závisí na druhu čisteného farmakologicky účinného proteínu a zistilo sa, že je medzi hodnotami 1 mM a 100 mM, výhodne medzi 1 mM a 30 mM.

Napríklad v prípade čistenia rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b) je koncentrácia roztokov solí medzi 1mM a 30mM, výhodne medzi 5 a 15 mM.

Potreba mať presné a stabilné hodnoty pH použitých eluentov na chromatografiu podľa predloženého vynálezu je veľmi vhodná hoci nie absolútne nevyhnutná, pri používaní vodných roztokov vhodne tlmených obsahujúcich 5 až 100 mM, výhodne 10 až 20 mM tlmivé zmesi. Každá chemická látka alebo zmes chemických látok, ktorá má tlmivú silu v oblasti pH medzi 2 a 11 sa môže s výhodou použiť, pretože pH hodnoty eluentov, ktoré sa môžu použiť sú medzi 2 a 11.

Mnohé vodné tlmivé roztoky sa môžu výhodne použiť pri uskutočňovaní predloženého vynálezu a majú nasledujúce zloženie: glycín a chlorid sodný, kyselina maleínová a hydroxid sodný, kyselina malónová a hydroxid sodný, kyselina mliečna a hydroxid sodný, kyselina mravčia a hydroxid sodný alebo lítny, kyselina sukcinová a hydroxid sodný, N-metylpiperazín a kyselina chlorovodíková, piperazín a kyselina chlorovodíková a kyselina octová, L-hystidín a kyselina chlorovodíková, 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínetánsulfónová kyselina a hydroxid sodný alebo lítny, N-metyldietanolamín a kyselina sírová, N-metyldietanolamín a kyselina chlorovodíková alebo kyselina octová, pyridín a kyselina mravčia, citran sodný a hydroxid sodný, ftalát draselný a kyselina chlorovodíková, ftalát draselný a hydroxid sodný, hydrogénfosforečnan draselný a dihydrogénfosforečnan sodný, bicín a hydroxid sodný, barbital sodný a kyselina chlorovodíková, boritan sodný a kyselina chlorovodíková, boritan sodný a hydroxid sodný, 1,3-diaminopropán a kyselina chlorovodíková, kyselina citrónová a fosforečnan monosodný, octan sodný a kyselina octová, imidazol a kyselina chlorovodíková, trietanolamín a kyselina chlorovodíková alebo octová, tris(hydroxymetylaminometán) a kyselina chlorovodíková, uhličitan sodný a kyslý uhličitan sodný, etanolamín a kyselina chlorovodíková, piperidín a kyselina chlorovodíková, trimetylamín a kyselina mravčia, pyridín a kyselina octová, trimetylamín a kyselina chlorovodíková, hydroxid amónny a kyselina mravčia, hydroxid

amónny a kyselina octová, trimetylamín a uhličitan sodný, uhličitan amónny a hydroxid sodný.

Najmä v prípade čistenia rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b) sa môžu použiť všetky tlmivé roztoky, ktoré vykazujú tlmiacu silu pri pH medzi 5,9 a 6,1, najmä tlmivé roztoky pri pH medzi 5,9 a 6,1 s obsahom hydrogénfosforečnanu draselného a dihydrogénfosforečnanu sodného, ftalátu draselného a hydroxidu sodného, citrátu sodného a hydroxidu sodného, kyseliny citrónovej a fosforečnanu sodného, imidazolu a kyseliny chlorovodíkovej, zatiaľ čo v prípade čistenia ľudského sérového albumínu sa môžu použiť tlmivé roztoky obsahujúce tie isté zmesi chemických zlúčenín vykazujúcich tlmivú silu pri pH 4,9 až 6,0.

Vodné roztoky použité ako eluenty môžu obsahovať navyše k chemickým látkam použitým na tlmenie pH tiež chemické látky, ktoré majú za úlohu modifikovať iónovú silu roztoku. S výhodou sa na tento účel používajú organické soli ako napríklad karboxyláty, alkylsulfonáty, ftaláty ako aj anorganické soli ako sú napríklad sírany, chloridy, fosforečnany, ktoré môžu byť sodné, draselné amónne, s primárnymi, sekundárnymi, terciálnymi alebo aromatickými amínmi.

Tieto zlúčeniny sa s výhodou používajú v koncentráciách 1 mM až 100 mM, výhodne 1 mM až 30 mM.

Napríklad v prípade čistenia rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b) sa koncentrácia týchto zlúčenín mení v rozsahu 1 mM až 30 mM, výhodne 2 až 20 mM.

Účinnosť čistenia sa môže zvýšiť pred elúciou farmakologicky účinných proteínov pomocou jedného alebo viacerých premývaní uskutočnených s eluentmi, ktoré majú vhodnú iónovú silu, pričom kolóna je vždy pri pH vyššom ako izoelektrický bod.

Napríklad v prípade ľudského sérového albumínu, ktorého pI je 4,9, sa premývanie môže uskutočniť s tlmivými roztokmi pri pH 5,5 až 5,8, zatiaľ čo v prípade rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b) s pI 5,9 sa premývanie uskutočňuje s tlmivými roztokmi pri 6,0 až 6,1.

Množstvo eluentu, ktoré prechádza počas týchto premývání sa mení a bežne sa pohybuje medzi 5 a 10 objemami kolóny (column volumes - CV).

Napríklad v prípade ľudského sérového albumínu sa premývania uskutočnili s 20 až 40 CV, zatiaľ čo v prípade rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b) s 10 až 80 CV.

Množstvo čisteného produktu, ktoré sa môže vložiť do kolóny závisí od použitých chromatografických matric a môže stúpať až do maximálnej hodnoty 100 mg celkových proteínov na milimeter stacionárnej fázy, pričom obvykle sa používajú nižšie množstvá medzi 5 až 20 mg/ml.

Eluenty môžu prechádzať cez kolónu s lineárnou rýchlosťou v závislosti na stacionárnej fáze po maximálnu hodnotu 10 cm/min.

Vyššie uvedený spôsob čistenia sa môže použiť na všetky farmakologicky účinné proteíny, ako je čistenie interferónových proteínov najmä vzhľadom na interferóny α , β , γ , δ , ω , τ , ďalej na prírodný interferón z leukocytov, cez rekombinantný α 2b a príbuzné interferóny a čistenie albumínu so špeciálnym ohľadom na ľudský albumín prírodného aj rekombinantného pôvodu sú výhodnými uskutočneniami predložených vynálezov.

Cieľom vyššie uvedeného čistiaceho procesu je získať ekonomicky a v priemyselnom merítku farmakologicky účinné proteíny s takým stupňom čistoty, aby sa dali priamo použiť do medicínálnych výrobkov s ich obsahom.

Výhodnými medicínálnymi výrobkami v rámci rozsahu predloženého vynálezu sú také, ktoré obsahujú rekombinantný α 2b interferón (rIFN α -2b) a albumín, výhodnejšie ľudský albumín prírodného a rekombinantného pôvodu.

Niektoré ilustratívne príklady spôsobu podľa vynálezu sú uvedené nižšie s jediným cieľom bližšie objasniť vynález, ale nemajú byť považované nijakým spôsobom ako obmedzujúce samotný vynález.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Produkcia rekombinantného α 2b interferónu (rIFN α -2b)

Časť buniek *Escherichia coli* kmeňa BL21 DE3 sa transformovala s 5 ng pET9a-IFN α -2b plazmidom získaného klonovaním syntetického génu reprodukovajúceho ľudskú génovú sekvenciu IFN α -2b, ktorý sa vhodne modifikoval na pripojenie sekvencie ku častejšie sa vyskytujúcim kodónom v *Escherichia coli* do plazmidu pET9a (Novagen).

Proteínová sekvencia exprimovaná z modifikovaných buniek *Escherichia coli* je rovnaká ako sekvencia uvedená v *Methods in Enzymology, Interferons, part C, Pestka S., 119, 3-14, (1986), Academic Press Inc.*

Kmeň *Escherichia coli* BL21 DE3 transformovaný pomocou pET9a-IFN α -2b plazmidu sa kultivoval v banke s vhodným kultivačným médiom, napríklad v roztoku obsahujúcom 12 g/l fytopeptónu (Phyto pepton, BBL), 24 g/l kvasinkového extraktu (Yeast extract, DIFCO), 4 g/l glycerolu (BDH) a neomycínu, pri 37 °C počas času dostatočného na získanie hodnoty optickej hustoty pri 600 nm 0,6 až 0,8, obvykle 7 až 9 hodín. Takto získaná kultúra sa potom použila pri zriedení 1 až 100 na inokuláciu 5 l fermentéru, kde je kultivačné médium to isté ako v bolo vyššie opísané v banke. Kultúra sa nechala 14 hodín pri 37 °C s aeráciou rovnou jednému objemu vzduchu za minútu vzhľadom na objem kultúry.

Bakteriálne bunky sa zbierali odstredovaním pri 6000 ot. za min. na konci kultivácie, suspendovali sa vo vhodnom vodnom roztoku s obsahom 1 mM ditiotreitolu (DTT) v množstve nie vyššom ako 6 ml na gram mokrej hmotnosti odstredených baktérií. Bakteriálna suspenzia sa podrobila bunkovej lýze pomocou známych a opísaných techník, napríklad pôsobením ultrazvuku alebo pôsobením hydraulického tlaku.

Výsledná suspenzia sa získala odstredovaním a tuhá časť sa suspendovala v 50 ml solného roztoku s obsahom 1 mM DTT a znovu sa odstredovala.

Tuhá zložka zahrňajúca telá sa zozbierala a suspendovala pri silnom miešaní pri izbovej teplote v 450 ml roztoku obsahujúceho 6 M guanidínium chlorid, 50 mM Tris HCl pri pH 8 a 0,1 mM EDTA. Suspenzia sa odstreďovala a supernatant sa zriedil na pomer 1 ku 100 až 1 ku 200 v solnom roztoku s obsahom 50 mM Tris HCl pri pH a 0,1 mM EDTA pri pH 8 vhodnom na renaturáciu proteínu. Roztok na renaturáciu obsahuje aminokyseliny ako napríklad glycín alebo arginín, zmes zlúčenín s obsahom sulfidov v oxidovanej a redukovanej forme s vytvoreným disulfidovým mostíkom, ako je napríklad glutatión, etanolamín, cysteín. Renaturácia sa uskutočňuje pri silnom miešaní roztoku pri 4 °C počas takmer 72 hod a potom sa roztok filtruje a potom koncentruje pomocou diafiltrácie oproti tlmivému roztoku pripravenému zo 40 mM Tris-HCl pri pH 8 po konečný koncentračný faktor 5 až 10 krát. Konečná koncentrácia roztoku je obvykle 0,4 až 1,0 mg/ml.

Príklad 2

Čistenie rekombinantného α -2b interferónu (rIFN α -2b)

1 M Roztok octanu sodného sa pridáva do konečnej koncentrácie 20 mM k zmesi proteínov, ktorá obsahuje rIFN α -2b pochádzajúci z príkladu 1 a zmes sa upraví na pH 5,5 s kyselinou octovou. Takto získaný roztok sa vloží do silnej katexovej kolóny s obsahom komerčne dostupnej chromatografickej matrice Mustang^R S (Pall Corporate). Katexová kolóna sa kondicionuje pred vložením roztoku proteínov pomocou 20 mM acetátu sodného pri pH 5,5 v množstve rovnom 20 objemov kolóny (CV).

Potom sa vloží proteínový roztok v takom množstve, že sa neprekročí hodnota 10 mg vložených proteínov na milimeter stacionárnej fázy, výhodne v množstvách 6 až 8 mg/ml.

Po vložení sa produkty naviazané k stacionárnej fáze podrobia prvému cyklu premývania so solným roztokom pri pH 6,1 zloženého zo zmesi hydrogénfosforečnanu draselného a dihydrogénfosforečnanu sodného pri celkovej koncentrácii 5 až 15 mM. Optimálna koncentrácia roztoku sa v každom prípade fixovala, pretože vodivosť nesmela presiahnuť 1800 μ S. Celkové použité množstvo roztoku bolo 5 až 60 CV, výhodne 25 až 35 CV.

Druhý cyklus premývania sa potom uskutočnil s použitím toho istého roztoku z prvého cyklu premývania, ku ktorému sa pridal chlorid draselný v takom množstve, aby konečná koncentrácia nepresahovala 3 mM, výhodne 2 mM, celkové použité množstvo roztoku bolo 10 až 100 CV, výhodne 30 až 60 CV.

Po premývacích cykloch sa uskutočnila elučná fáza s použitím roztoku ako z prvého premývacieho cyklu s konečným množstvom chloridu draselného v koncentrácii nie nižšej ako 10 mM, výhodne pri koncentrácii 15 až 25 mM. Celkové použité množstvo roztoku na elúciu bolo 15 až 40 CV, výhodne 20 až 30 CV.

Všetky roztoky a vložené vzorky prešli cez kolónu pri lineárnej rýchlosti 0,1 až 1 cm/min, výhodne 0,4 až 0,7 cm/min.

V týchto podmienkach sa rINF α -2b eluoval z kolóny so stupňom čistoty vyšším ako 98 %, zatiaľ čo čistota počiatočného roztoku bola 40 %, s výťažkom získavania želaného produktu vyšším ako 80 %.

Chromatografické profily pred a po chromatografickom čistení sú ukázané na obr. 1a a 1b.

Obr. 1a ukazuje chromatografický profil interferónového roztoku pred čistením a obr. 1b chromatografický profil po čistení.

Chromatografické profily sa uskutočnili s HPLC v kvapalnom chromatografe HP 1090 s použitím kolóny Vydac C18 a UV detektora nastaveného na 214 nm. Elúcia sa uskutočnila pri prietoku 1 ml/min so zmesou z dvoch eluentov, eluent A pozostával zo 700 ml vody, 298 ml acetonitrilu a 2 ml kyseliny trifluóroctovej a eluent B pozostával z 198 ml vody, 800 ml acetonitrilu a 2 ml kyseliny fluóroctovej. Dva eluenty sa zmiešali počas elúcie podľa nasledujúcej tabuľky:

Čas (min.)	% A	% B
0	72	28
1	72	28
5	67	33
20	63	37
30	57	43
40	40	60
42	40	60
50	28	72
60	72	28

Príklad 3

Spôsob sa uskutočnil podľa príkladu 2 s použitím tlmivého roztoku pripraveného z ftalátu draselného a hydroxidu sodného.

Príklad 4

Spôsob sa uskutočnil podľa príkladu 2 s použitím tlmivého roztoku pripraveného z citrátú sodného a hydroxidu sodného.

Príklad 5

Spôsob sa uskutočnil podľa príkladu 2 s použitím tlmivého roztoku pripraveného z kyseliny citrónovej a dihydrogénfosforečnanu sodného.

Príklad 6

Spôsob sa uskutočnil podľa príkladu 2 s použitím tlmivého roztoku pripraveného z imidazolu a kyseliny chlorovodíkovej.

Príklad 7

Čistenie ľudského sérového albumínu

Ľudský sérový albumín (LSA) sa získal od Sigma (katalógové číslo A1653 z roku 2000). Nominálne množstvo tohto albumínového prípravku bolo stanovené na 99,6 %, ale RP-HPLC analýza ukázala reálne množstvo 88 %, pričom produkty podobné albumínu sú považované za nečistoty. Roztok LSA sa pripravil v 20 mM

kyseline citrónovej pri pH 3 s konečnou koncentráciou rovnou 1 mg/ml a vložil sa do silnej katexovej kolóny obsahujúcej matricu Mustang^R S (Pall Corporate), ktorá je komerčne dostupná. Katexová kolóna sa kondicionovala pred vložením vzorky s 20 mM kyseliny citrónovej pri pH 3,0 v množstve rovnom 20 kolónových objemov (CV).

Množstvo vloženého roztoku je také, že sa neprekročila hodnota 10 mg vložených proteínov na milimeter stacionárnej fázy, výhodne 6 až 8 mg/ml.

Po vložení sa produkty naviazané k stacionárnej fáze podrobili nasledujúcim cyklom premývania:

1. premývací cyklus - 40 CV s 20 mM roztokom octanu sodného pri pH 5,5,
2. premývací cyklus 30 CV s 20 mM roztokom octanu sodného pri pH 5,8.

Elúcia želaného produktu z kolóny sa uskutočnila pomocou solného roztoku pri pH 6,0 pozostávajúceho zo zmesi hydrogénfosforečnanu draselného a dihydrogénfosforečnanu sodného pri koncentrácii 5 až 100 mM v závislosti od zloženia zmesi. Avšak vodivosť roztoku nesmie presiahnuť 140 μ S. Celkové použité množstvo roztoku bolo 25 až 35 CV.

Všetky roztoky a vložené vzorky prechádzajú cez kolónu s lineárnou rýchlosťou 0,1 až 1 cm/min, výhodne 0,4 až 0,7 cm/min.

V týchto podmienkach sa LSA eluoval z kolóny s čistotou vyššou ako 99 % s výťažkom získania želaného produktu vyšším ako 56 %.

Obrázky 2a a 2b ukazujú HPLC chromatografický profil LSA pred a po čistení. Analýzy sa uskutočnili s tými istými prístrojmi ako je to v prípade obr. 1a a 1b s použitím zmesi dvoch eluentov, eluent A pripravený z 950 ml 0,1 % kyseliny trifluóroctovej a 50 ml acetonitrilu a eluentu B pripraveného z 950 ml acetonitrilu a 50 ml 0,1 % kyseliny trifluóroctovej. Elúcia sa uskutočnila s prietokom 1 ml/min pri gradiente zmesi eluentov A a B, ktorý začína pri 20 % B a dosahuje 60 % B počas 20 minút.

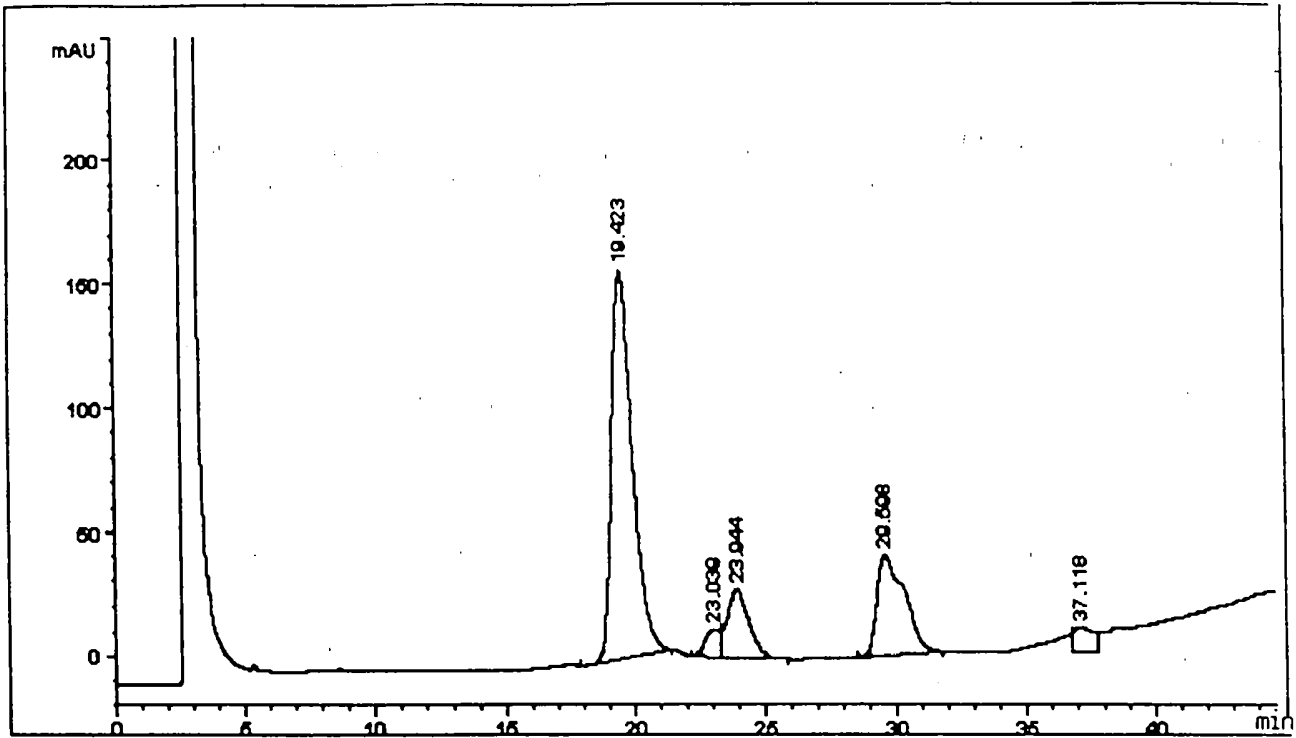
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob čistenia farmakologicky účinných proteínov, ktorý zahŕňa katexovú chromatografiu na tuhej matrici pri zásaditejšom pH ako zodpovedá izoelektrickému bodu pI čistených proteínov, pričom pri tomto pH sú proteíny ešte absorbované, a elúciu týchto proteínov zvýšením iónovej sily a/alebo pH eluentov.
2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že eluenty použité na katexovú chromatografiu sú tvorené vodnými tlmivými roztokmi s pH 2 až 11.
3. Spôsob podľa nároku 2, vyznačujúci sa tým, že pH vodných tlmivých roztokov je 4 až 8,5.
4. Spôsob podľa nárokov 2 a 3, vyznačujúci sa tým, že vodné tlmivé roztoky obsahujú 5 až 100 mM nasledujúcich tlmivých zmesí: hydrogénfosforečnan draselný a dihydrogénfosforečnan sodný, ftalát draselný a hydroxid sodný, citrát sodný a hydroxid sodný, kyselina citrónová a dihydrogénfosforečnan sodný, imidazol a kyselina chlorovodíková.
5. Spôsob podľa nárokov 2 až 4, vyznačujúci sa tým, že tlmivé roztoky obsahujú 1 až 100 mM organických alebo anorganických solí na modifikáciu iónovej sily roztoku.
6. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že farmakologicky účinnými proteínmi sú interferón a albumínové proteíny.
7. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že interferónové proteíny sú α , β , γ , δ , ω , τ , prírodný α z leukocytov, rekombinantný α -2b a príbuzné interferóny a albumínové proteíny sú prírodným a rekombinantným ľudským albumínom.
8. Spôsob čistenia rekombinantného α -2b interferónu, rIFN α -2, ktorý zahŕňa vloženie proteínovej zmesi pochádzajúcej z výroby fermentáciou rIFN α -2b, do ktorej sa pridal 1 M roztok octanu sodného a pH sa upravilo na 5,5 s kyselinou octovou, do kolóny plnenej so silnou katexovou živicom kondicionovanou pri pH 5,5 s 20 mM roztokom octanu sodného,

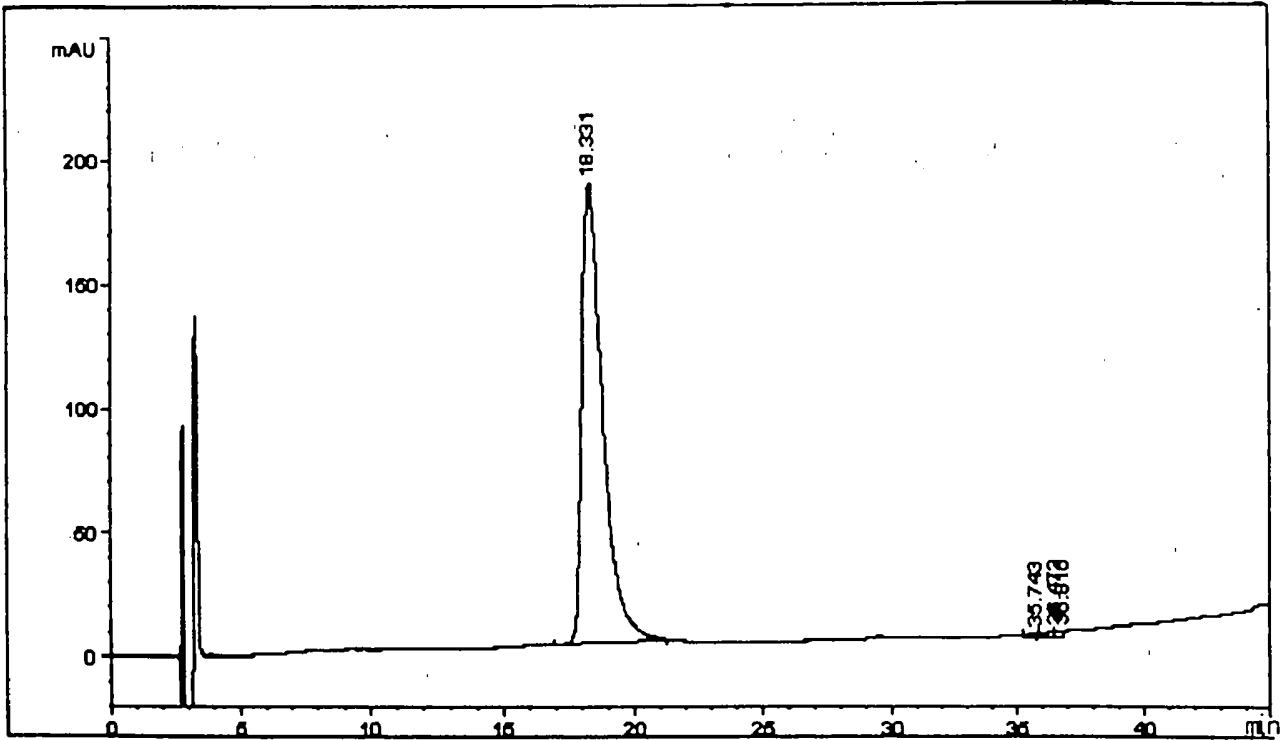
pričom 6 až 8 mg proteínov je prítomných v každom mililitri stacionárnej fázy, podrobenie kolóny dvom premývacím cyklom, najskôr s tlmivým roztokom pri pH 6,1 pri koncentrácii 5 až 15 mM, potom s tým istým tlmivým roztokom obohateným o 2 mM chlorid draselný a nakoniec eluovanie čistého rIFN α -2b z kolóny s použitím tlmivého roztoku pri pH 6,1 v koncentrácii 5 až 15 mM s obsahom chloridu draselného v koncentrácii 15 až 25 mM.

9. Spôsob podľa nároku 8, **vyznačujúci sa tým, že** použitou maticou je Mustang^R S a tlmivé zmesi sú vybrané z hydrogénfosforečnanu draselného a dihydrogénfosforečnanu sodného, ftalátu draselného a hydroxidu sodného, citrátu sodného a hydroxidu sodného, kyseliny citrónovej a dihydrogénfosforečnanu sodného, imidazolu a kyseliny chlorovodíkovej.
10. Spôsob čistenia ľudského sérového albumínu, ktorý zahŕňa vloženie roztoku obsahujúceho ľudský sérový albumín upravený na pH 3 kyselinou citrónovou do kolóny plnenej so silnou katexovou živicom kondicionovanou pri pH 3 s 20 mM roztokom kyseliny citrónovej, pričom 6 až 8 mg proteínu je prítomných v každom ml stacionárnej fázy, kolóna sa podrobí dvom premývacím cyklom s 20 mM roztokmi octanu sodného, následne upravenie pH na 5,5 až 5,8 a potom sa eluuje z kolóny čistý ľudský sérový albumín tlmivým roztokom pri pH 6,0 pozostávajúci zo zmesi hydrogénfosforečnanu draselného a dihydrogénfosforečnanu sodného v koncentráciách 5 až 100 mM.
11. Použitie spôsobu podľa ktoréhokolvek z predchádzajúcich nárokov na výrobu účinných látok obsiahnutých v medicínskych výrobkoch založených na farmakologicky účinných proteínoch.
12. Použitie podľa nároku 11, v ktorom účinnými látkami sú interferónové proteíny.
13. Použitie podľa nároku 12, v ktorom je interferónovým proteínom rekombinantný α -2b interferón.

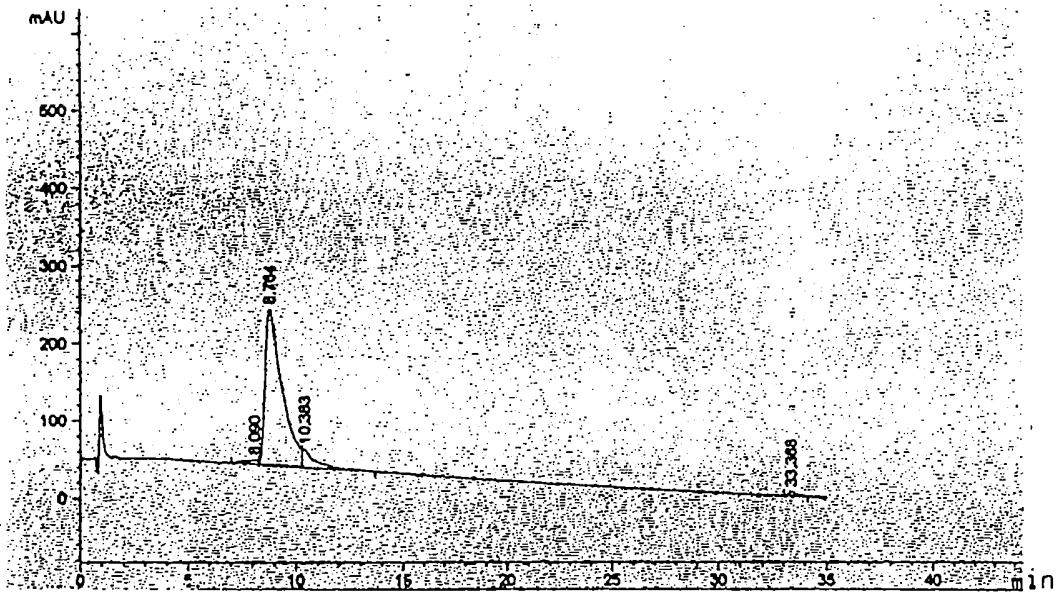
14. Použitie podľa nároku 11, v ktorom účinnými látkami sú albumínové proteíny.
15. Použitie podľa nároku 14, v ktorom albumínové proteíny sú prírodným alebo rekombinantným ľudským sérovým albumínom.



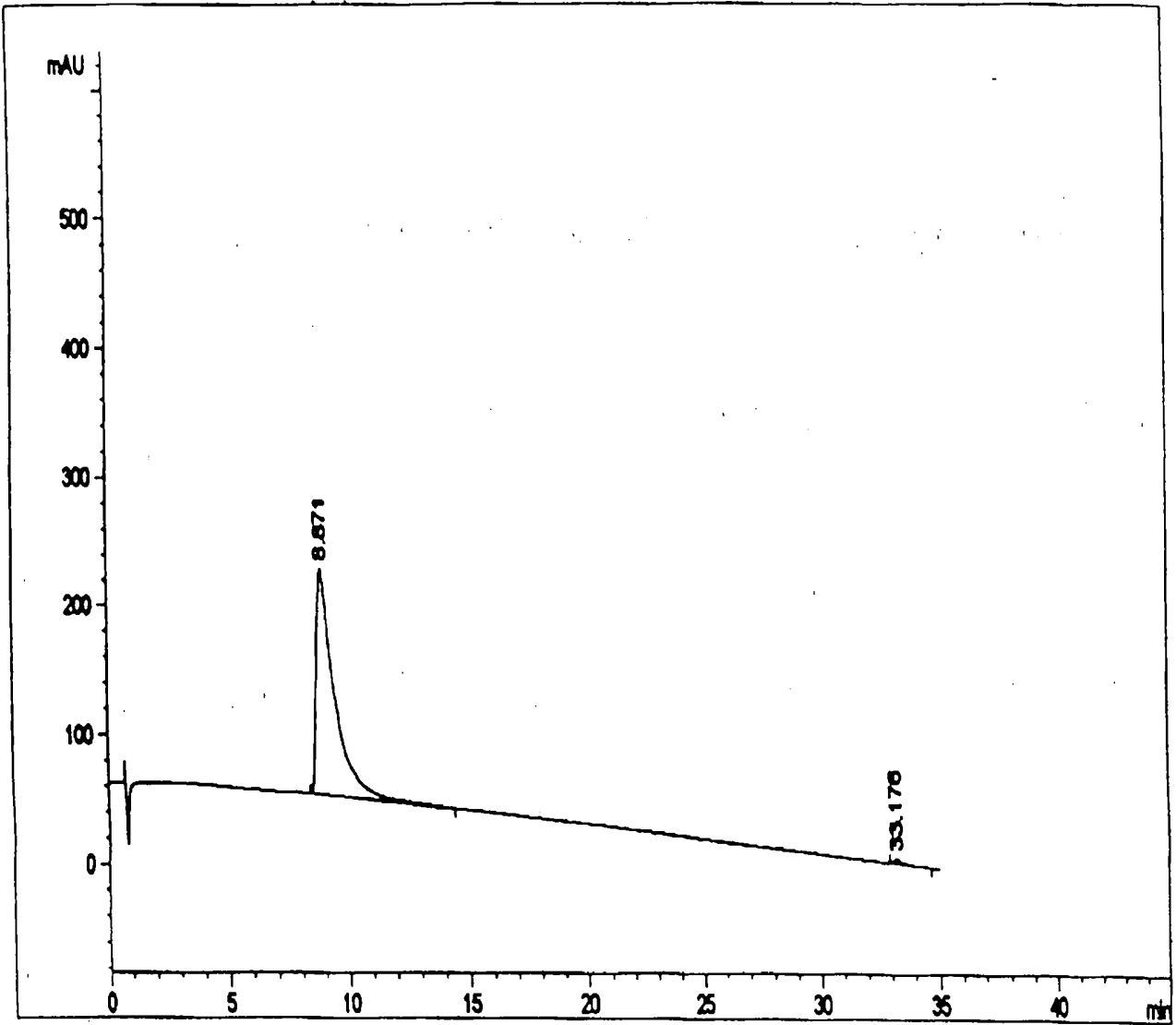
Obr. 1a



Obr. 1b



Obr. 2a



Obr. 2b