



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 850 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 96 02313
(22) A bejelentés napja: 1995. 02. 21.
(30) Elsőbbségi adatok:
08/200,126 1994. 02. 22. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 95/01823
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 95/22389

(51) Int. Cl.⁷

B 01 D 15/08

C 07 K 16/00

C 07 K 1/16

C 07 K 1/36

(40) A közzététel napja: 1997. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 04. 28.

(72) Feltalálók:

Erickson, John C., Conshohocken, Pennsylvania
(US)
Scott, Robert G., Collingswood, New Jersey (US)
Shadle, Paula J., Gulph Mills, Pennsylvania (US)
Smith, Thomas M., Drexel Hill, Pennsylvania
(US)

(73) Szabadalmas:

SmithKline Beecham Corp., Philadelphia, Penn-
sylvania (US)

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Eljárás antitest tisztítására

KIVONAT

A találmány egyik tárgya eljárás monomer immunglobulin G antitestnek egy monomer immunglobulin G antitestet és legalább egy immunglobulinaggregátumot, hibás formát, gazdasejtproteint vagy Protein A-t tartalmazó keverékből történő tisztítására.

A találmánynak egy másik tárgya eljárás monomer immunglobulin G antitestnek egy monomer immunglobulin G antitestet tartalmazó, kondicionált sejtenyésző médiumból történő tisztítására, amelynek során a médiumot egymást követően a) Protein A-kromatográfiának, b) ioncserés kromatográfiának és c) hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának vetik alá.

A találmánynak egy harmadik tárgya eljárás antitestnek kondicionált médiumból történő tisztítására, amelynek során

- az antitestet egy Protein A-kromatográfiás tölteten adszorbeáltatják;
- az adszorbeált antitestet legalább egy pufferrel mosásák;

- a b) lépésben kapott antitestet eluálják;
- a c) lépésben kapott antitestet egy ioncserés kromatográfiás tölteten adszorbeáltatják;
- az adszorbeált antitestet legalább egy pufferrel mosásák;
- az e) lépésben kapott antitestet szelektíven eluálják;
- az f) lépésben kapott eluátumot egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás tölteten adszorbeáltatják;
- az adszorbeált antitestet legalább egy pufferrel mosásák;
- az adszorbeált antitestet eluálják; és
- kinyerik az antitestet.

A találmánynak egy negyedik tárgya eljárás Protein A-nak egy Protein A-t és antitesteket tartalmazó keverékből történő eltávolítására, amelynek során a keveréket egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltettel érintkeztetik, majd a töltetről szelektíven eluálják az antitestet.

HU 217 850 B

A találmány tárgya eljárás proteintisztításra. Közlebb-
ről a találmány a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiá-
nak (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)
az immunglobulin G monomerek elválasztására történő
alkalmazására, valamint a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának egy, az IgG antitestmolekulák tisztítására szolgáló kombinációs kromatográfiás rendszerbe történő beépítésére vonatkozik.

A korábbiakban a proteintisztítási eljárások a tisztítandó protein és a nemkívánatos proteinszennyező anyagok közötti, a molekuláris tulajdonságokban, így a méretben, a töltésben és oldékonyságban meglévő eltérések felhasználásán alapultak. Az említett paramétereken alapuló eljárások közé tartozik a méretkizárási kromatográfia, az ioncserés kromatográfia, a kicsapásos frakcionálás (differenciális precipitáció) stb.

A méretkizárási kromatográfia (vagy más néven gélszűrés, illetve gélpermeációs kromatográfia) alapját az képezi, hogy a mozgó fázisban lévő makromolekulák behatolnak az álló fázis részecskéinek pórusaiba. A különböző makromolekulák eltérő behatolása (penetrációja) a részecskék hidrodinamikai térfogatának a függvénye. Ideális körülmények között a nagyobb molekulák nem juthatnak be a részecskék belsejébe, míg a kisebb molekulák számára elérhető az adott térfogatú üreg. Ennek megfelelően az elúció sorrendje a protein mérete szerint előre meghatározható, mivel lineáris összefüggés áll fenn az elúciós térfogat és a molekulatömeg logaritmus között.

A találmány szerinti eljárás gyakorlati megvalósításában alkalmazott méretkizárási kromatográfia vagy hidrofób kölcsönhatási kromatográfia esetén felhasznált különféle kromatográfiás oszlopok előállításához például a következő anyagokon alapuló kromatográfiás tölteteket használhatjuk: térhálósított dextransok, például SEPHADEX® (Pharmacia AB., Uppsala, Svédország); gömbszerű agarózgyöngyök, például SEPHAROSE® (Pharmacia AB., Uppsala, Svédország); térhálósított poliakrilamidok, például BIO-GEL® (BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok); valamint etilénlikol/metakrilát kopolimerek, például TOYOPEARL HW65 (Toso Haas Co., Tokió, Japán).

A precipitációs eljárások azon az elven alapulnak, hogy a proteinek nyers keverékeiben az egyedi proteinek oldékonysága meglehetősen széles tartományban változik. Jóllehet egy vizes közegben egy adott protein oldékonyságát számos tényező befolyásolja, a jelen találmány céljai szempontjából általánosan megállapíthatjuk, hogy egy protein akkor oldható, ha a protein és az oldószer közötti kölcsönhatás erősebb, mint az azonos vagy a hasonló típusú proteinek közötti kölcsönhatás. Anélkül, hogy a precipitációs jelenség leírásával kapcsolatban bármilyen konkrét mechanisztikus elmélethez ragaszkodnánk, véleményünk szerint egy protein és a vízmolekulák közötti kölcsönhatás a különféle típusú töltés nélküli csoportok és a vízmolekulák között kialakuló hidrogénhidkötések révén és/vagy a töltéssel rendelkező csoportok és a vízmolekulák mint dipólok között elektrosztatikusan jön létre; a kicsapószerek, pél-

dául az egyértékű kationok sói (például az ammónium-szulfát) versengenek a proteinnel a vízmolekulákért. Magas sókoncentrációk esetén a proteinek „dehidratáltá” válnak, miáltal csökken a vizes környezettel szembeni kölcsönhatásuk intenzitása, ennek következtében az ugyanolyan vagy a hasonló típusú proteinek aggregálódnak, amelynek eredményeként kicsapódnak a közegből.

Az ioncserés kromatográfia során azt a kölcsönhatást használjuk ki, amely a mintában lévő, töltéssel rendelkező funkció csoportok és egy adszorbens felületen lévő, ellentétes töltésű, ionos funkció csoportok között lép fel. Ennek a kölcsönhatásnak két fő típusa ismert. Az anionos ioncserés kromatográfia során a negatív töltésű aminosav-oldalláncok (például az aszparaginsav és a glutaminsav-oldalláncok) lépnek kölcsönhatásba a pozitív töltésű felületekkel, míg a kationos ioncserés kromatográfia során a pozitív töltésű aminosavcsoportok (például a lizin- és arginincsoportok) lépnek kölcsönhatásba a negatív töltésű felületekkel.

A hagyományos méretkizárási és ioncserés kromatográfiás eljárások kiegészítése, illetve helyettesítése érdekében kerültek kifejlesztésre a közelmúltban az úgynevezett affinitáskromatográfiás és hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás eljárások. Az affinitáskromatográfia a protein és egy immobilizált ligand közötti specifikus kölcsönhatáson alapul. A ligand specifikus lehet a kérdéses egyedi proteinnel nézve, és ebben az esetben a ligand például egy szubsztrát, egy szubsztrátanalóg, egy inhibitor, egy receptor vagy egy antitest lehet. Alternatív módon a ligand képes lehet több hasonló proteinnel reagálni. A proteinek egy egyedi osztályának kinyeréséhez specifikus ligandokként például adenzinmonofoszfátot, adenzin-difoszfátot, nikotin-adenin-dinukleotidot vagy bizonyos színezékeket alkalmazhatunk.

Az antitestmolekulák tisztítására a specifikus és az általános (generalizált) affinitáskromatográfia egyaránt felhasználható. Egy antitest affinitáskromatográfiás tisztításához a legspecifikusabb ligand az az antigén, amellyel a kívánt antitest reakcióba lép. Számos jól ismert immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) az ilyen specifikus antigén/antitest affinitási kölcsönhatáson alapul.

Ugyanakkor azonban az általános affinitáskromatográfiás eljárások is igen jól hasznosíthatók. Például a *Staphylococcus* Protein A-ról ismert, hogy hozzákötődik az IgG osztály bizonyos antitestjeihez [Ey, P. L. *et al.*, *Immunochemistry*, 15., 429–436. (1978)]. Alternatív módon a heterológ speciesekben képződő antiszérumok (például a nyúl antieger antiszérumok) felhasználhatók az antitestek általános csoportjainak az elválasztására (Current Protocols in Molecular Biology, *Supra*, Chap. 11).

A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiát első ízben azt követően fejlesztették ki, hogy megfigyelték, a proteinek képesek visszamaradni az olyan affinitásgéleken, amelyek térköztartó (spacer) szénhidrogénláncokat tartalmaznak, de amelyekből hiányzik az affinitásligand.

Jóllehet a szakterületen időnként a hidrofób kromatográfia kifejezést alkalmazzák, előnyösen inkább a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia kifejezést használjuk, mivel ebben az esetben maga az oldott anyag és a gél közötti kölcsönhatás a hidrofób jellegű, nem pedig a kromatográfiás eljárás. A hidrofób kölcsönhatások nagy ionerősség mellett a legerősebbek, ezért az elválasztásnak ezt a formáját előnyösen sókicsapások vagy ioncserés eljárások után alkalmazzuk. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás oszloptöltetekről az elúciót az oldószer, pH-érték, ionerősség változtatásával vagy kaotrop szerek, illetve szerves modifikáló anyagok, például etilén-glikol vagy propilén-glikol hozzáadásával hajthatjuk végre. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia alapelveinek összefoglalása megtalálható például a 3 917 527 és a 4 000 098 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának az egyedi proteinek tisztítására történő felhasználásáról – egyebek mellett – például a következő szabadalmi és szakirodalmi dokumentumokban találunk ismertetést: humán növekedési hormon (4 332 717 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), toxinkonjugátumok (4 771 128 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), antihemolitikus faktor (4 743 680 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), tumor nekrozis faktor (4 894 439 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), interleukin-2 (4 908 434 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), humán lymphotoxin (4 920 196 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), lizozimfélek [Fausnaugh, J. L. and F. E. Regnier, *J. Chromatog.*, 359., 131–146. (1986)], valamint oldható komplement receptorok (5 252 216 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) összekapcsolt hidrofób kölcsönhatási kromatográfiát a korábbiakban már felhasználták antitestfragmentumoknak [például F(ab')₂] az intakt antitestmolekulából egy lépéses eljárásban történő elkülönítésére [Morimoto, K. *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24., 107–117. (1992)].

Az affinitáskromatográfiás és a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás eljárásokon kívül az antitestek tisztítására a korábbiakban egy vagy több hagyományos proteintisztítási eljárást is alkalmaztak. Például Hakalahti olyan eljárást írt le, amelynek során két egymást követő ioncserés kromatográfiás lépést vagy egy ioncserés kromatográfiás lépést és egy ezt követő hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépést alkalmaznak [Hakalahti, L. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 117, 131–136 (1989)]. Danielsson összehasonlítást végzett a következő egy lépéses eljárások között: anionos ioncserés kromatográfia, kationos ioncserés kromatográfia, kromatofokuszálás és hidrofób kölcsönhatási kromatográfia [Danielsson, A. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 115., 79–88. (1988)].

A Protein A affinitás-oszlopkromatográfiát ugyan széles körben használják, de ismert az is, hogy az ilyen oszlopkokról végzett antitestelúció a Protein A egy részének az oszloptöltetről történő lemosását eredményezhe-

ti. Ennek a problémának a megoldására egyrészt a méretkizárásos nagy teljesítményű folyadékkromatográfia [Das *et al.*, *Analytical Biochem.*, 145., 27–36. (1985)], másrészt az anionos ioncserés kromatográfia (345 549 számú európai szabadalmi bejelentés) alkalmazását ajánlják.

Arra a felismerésre jutottunk, hogy a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia jól felhasználható a szennyező Protein A-nak a Protein A-kromatográfiás oszloptöltetről eluált IgG-keverékekből történő eltávolítására.

A jelen találmány tárgya a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (HIC) alkalmazása immunglobulin G monomereknek ilyen monomereket és legalább egy immunglobulinaggregátumot, hibás formát, gazdasejt-proteint vagy Protein A-t tartalmazó keverékekből történő elválasztására, valamint a találmány a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának egy, az immunglobulin G molekulák tisztítására szolgáló Protein A- és ioncserés kromatográfiás kombinált rendszerbe történő beépítésére vonatkozik.

A jelen találmány egyik tárgya eljárás IgG monomereknek ilyen monomereket tartalmazó aggregátumkeverékekből történő elválasztására, amelynek során a keveréket egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltettel érintkeztetjük, és a monomert a töltetről szelektíven eluáljuk.

A jelen találmány egy másik tárgya eljárás IgG antitestnek egy ilyen antitestet tartalmazó kondicionált sejtenyésző médiumból történő tisztítására, amelynek során a médiumot egymást követően a) Protein A-kromatográfiának, b) ioncserés kromatográfiának és c) hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának vetjük alá.

A jelen találmány egy további tárgya eljárás Protein A-nak egy Protein A-t és antitesteket tartalmazó keverékekből történő eltávolítására, amelynek során a keveréket egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltettel érintkeztetjük, és az antitestet a töltetről szelektíven eluáljuk.

Az 1. ábra az egyik, antitestek tisztítására szolgáló találmány szerinti eljárás folyamatábráját mutatja be.

A jelen találmány olyan proteintisztítási eljárásokra vonatkozik, amelyek az immunglobulinmolekulák nagy, ipari mennyiségének tisztítására is alkalmasak. A találmány szerinti megoldás különösen jól felhasználható, mivel a monomer IgG 95%-nál nagyobb proteintisztasággal történő előállítására ad módot. A találmány szerinti eljárás számos, egymástól eltérő immunglobulin G molekula tisztítására alkalmas.

Az antitestszerű proteinek olyan proteinek, amelyek megtisztíthatók a jelen leírásban ismertetett eljárások alkalmazásával, illetve kívánt esetben a találmány szerinti eljárások rutinszerű, feltalálói tevékenységet és további kísérletezést nem igénylő módosításaival az adott igényekhez igazított változatainak az alkalmazásával. Az ilyen jellegű proteinek közé tartoznak – egyebek mellett – például a következők: az immunglobulin gének izotípusai, allotípusai és alléljei; megcsonkított formák; módosított antitestek, például kiméra antitestek, humanizált antitestek stb.; kémiai úton, például polietilén-glikolos (PEG) reakcióval módosított formák; valamint

immunglobulinrészt tartalmazó fúziós proteinek. Ezeket a proteineket azért hívjuk antitestszerű proteineknek, mert a találmány szerinti eljárás alkalmazásával végzett tisztításhoz elegendő immunglobulinprotein jellemzővel rendelkeznek, illetve ehhez elegendő immunglobulinprotein jellemzőt (például F_c determinánst) tartanak meg. Amennyiben kifejezetten másképpen nem jelöljük, az antitest vagy az immunglobulin protein kifejezés magában foglalja az antitestszerű proteineket is.

A találmány szerinti eljárás során felhasználható immunglobulinmolekulák rendkívül sokféle forrásból izolálhatók; ilyenek – egyebek mellett – például a következők: immunizált állatok széruma, ascites folyadék, hybridoma és myeloma felülűszók, immunglobulinmolekulát expresszáló rekombináns sejtvonal tenyésztéséből származó kondicionált médiumok és az immunglobulint termelő sejtek teljes sejtextaktumai. A találmány szerinti megoldás különösen jól alkalmazható a különféle antitesteket termelő rekombináns sejtvonalak kondicionált sejtenyésztő médiumaiból származó antitestek tisztítására. Jóllehet az egyes sejtvonalak, illetve a különféle antitesttermékek között jelentős eltérések lehetnek, az ezen a területen jártas szakember nehézségek nélkül képes megfelelően adaptálni a jelen leírásban ismertetett eljárást az adott antitestproteinre és az ezt termelő sejtvonalra.

Általában a proteineket, például antitesteket kódoló géneket, úgy klónozzhatjuk, hogy a polipeptid kívánt régióit kódoló DNS-szekvenciákat beépítjük egy rekombináns DNS-anyagba (például egy vektorba), majd alkalmas prokaryota és eukaryota gazdaszervezeteket transzformálunk vagy transzfektálunk. Az alkalmas prokaryota gazdaszervezetek közé tartoznak – egyebek mellett – például a következők: *Escherichia*, *Streptomyces*, *Bacillus* stb. Az alkalmas eukaryota gazdaszervezetek közé tartoznak – egyebek mellett – például a következők: élesztő, például *Saccharomyces*, valamint a tenyésztetben lévő állati sejtek, például VERO, HaLa, C127 egér, kínaihörcsög-petefészek (Chinese hamster ovary; CHO), WI-38, BHK, COS, MDCK, myeloma- és rovarsejtvonalak. Különösen előnyös gazdaszervezetek az olyan CHO-sejtvonalak, amelyekből hiányzik a dihidrofolát-reduktáz; ilyenek például a következők: ATCC CRL 1793, CRL 9096 és más, az alábbiakban ismertetett sejtvonalak. Az ilyen rekombináns módszerek mára már jól ismertté váltak, leírásuk megtalálható például a következő szakirodalmi helyeken: *Methods in Enzymology* (Academic Press), Volumes 65 and 69 (1979), 100 and 101 (1983), valamint az ezekben hivatkozott további publikációk. A leggyakrabban alkalmazott DNS-metodológiák gyakorlati megvalósításának részletes technikai leírása például a következő szakirodalmi helyeken található meg: Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982); valamint *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, Wiley Interscience (1988, 1991, 1993).

Egy kívánt polipeptidet, például egy antitestmolekulát kódoló DNS-fragmentum előállításának egyik módja a cDNS-klónozás. Ebben az eljárásban messenger

RNS-t (mRNS-t) izolálunk olyan sejtekből, amelyekről ismert vagy valószínűsíthető, hogy a kívánt proteint termelik. Enzimatis reakciók sorozatán keresztül a sejtek mRNS-populációját bemásoljuk egy komplementer DNS-be (cDNS-be). Az így nyert cDNS-t ezt követően klónozóanyagba inszertáljuk, majd alkalmas prokaryota vagy eukaryota gazdaszervezetek transzformálására alkalmazzuk. Az így kapott cDNS „könyvtár” a transzformált gazdasejtek populációjából áll, ahol a transzformált gazdasejtek mindegyike egyetlen gént vagy génfragmentumot tartalmaz. Elméletileg a teljes könyvtár a kiindulási anyagként alkalmazott mRNS-keverékben lévő kódoló információknak egy reprezentatív mintáját szolgáltatja. A specifikus DNS-szekvenciák azonosítása érdekében a könyvtárakat nukleinsav- vagy antitestpróbákkal szkrínelhetjük. Izolálás után ezeket a DNS-szekvenciákat módosíthatjuk vagy összeállíthatjuk komplett génekké.

Egy antitestgén specifikus fragmentumait a gén további részétől függetlenül megtervezhetjük. Módosított antitestek előállítása érdekében a komplementaritást meghatározó régiókat (Complementarity Determining Regions, CDRs) kódoló DNS-fragmentumokat beépíthetjük heterológ specíesekből származó szerkezeti DNS-szekvenciákba. Az ilyen módosított antitestek igen fontos felhasználást nyerhetnek bizonyos nemkívánatos fiziológiás állapotok kezelésében. Például a WO 92/04381 számon közzétett, PCT/GB91/01554 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben az RSV-fer-tőzés (Respiratory Syncytial Virus) kezelésére és megelőzésére felhasználható „humanizált” antitestek előállítását ismertetik. Alternatív módon az antitestgén teljes variábilis régióját hozzáköthetjük egy második antitest állandó doménjéhez, és így olyan módosított antitestet képezünk, amely mint „kiméra antitest” ismert. Például a WO 93/02108 számon közzétett, PCT/US92/06194 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben egy, a humán CD4-receptorral reagálni képes majom/humán kiméra antitestet ismertetnek.

Amikor egy antitestgén vagy -génfragmentum már klónozva van, a DNS bevezethető egy expressziós vektorba, majd ezt a konstrukciót felhasználhatjuk egy megfelelő gazdasejt transzformálására. Egy expressziós vektorra az jellemző, hogy rendelkezik az alábbiakban ismertetett expressziós kontrollszekvenciákkal, és így ha egy kérdéses DNS-szekvencia működőképesen hozzá van kötve, a vektor alkalmas a kérdéses DNS-szekvencia által kódolt termék termelésének az irányítására egy, a vektort tartalmazó gazdasejtben. A jelen találmány szerinti megoldással kapcsolatban lehetőség nyílik arra, hogy egyetlen kódolószekvenciájú fragmentumokat állítsunk össze, és így az expresszió során egy antitestmolekula képződik. A rekombináns antitest előállítására irányuló ezen eljárásnak egy különösen hatékony felhasználását írják le például a WO 92/04381 számon közzétett, PCT/GB91/01554 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben, valamint a WO 93/02108 számon közzétett, PCT/US92/06194 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben.

A rekombináns termék előállítása után szükség van a termék kinyerésére. Amennyiben a termék kikerül a

terméket előállító sejtől, a terméket közvetlenül kinyerhetjük a sejtenyésző médiumból. Ha viszont a termék intracellulárisan marad vissza, az intracelluláris termék kinyerése érdekében a sejteket mechanikus, kémiai vagy biológiai eszközökkel fizikailag el kell ronszolni.

Egy proteintermék esetén a tisztítási eljárásnak nemcsak olyan proteinterméket kell biztosítania, amely lényegében mentes az egyéb proteinektől, azaz amely a preparátumban lévő teljes proteinmennyiségre vonatkoztatva legalább 80%-os, előnyösen 95%-nál nagyobb tisztaságú, hanem biztosítania kell az egyéb gazdasejtszennyező anyagok, DNS, RNS, potenciális pirogénok stb. eltávolítását vagy elfogadható szintre való csökkentését is. Az előbbieken kívül a rekombináns expressziós rendszerrel előállított antitesttel kapcsolatban lényeges az is, hogy a 150 000 daltonos molekulatömegű IgG-termék nagyobb molekulatömegű fajtákká aggregálódhat. A terméktisztaság és a termék standardizálása szempontjából a találmány szerinti eljárás igen előnyösen alkalmazható a natív 150 000 dalton molekulatömegű monomerfajtáknak a nagyobb molekulatömegű aggregátumoktól és egyéb, hibás formáktól történő elválasztására. Hangsúlyozni kívánjuk, hogy noha a 150 000 dalton molekulatömegű IgG-fajták négy polipeptidláncból (két nehéz láncból és két könnyű láncból) épülnek fel, a jelen leírásban „monomerek”-nek vagy „monomer IgG”-nek a 150 000 dalton molekulatömegű speciéseket nevezzük.

Amint azt a fentiekben már említettük, a találmány szerinti eljárásban igen sokféle gazdasejtet alkalmazhatunk az antitestek termelésére. A konkrét gazdasejt kiválasztása az ezen a területen jártas szakember számára nem jelent nehézséget. A gazdasejt kiválasztását befolyásoló tényezők közül példaképpen megemlítjük az antitest jellegét, az antitest szintézisének sebességét, az antitest bomlásának sebességét, valamint az antitest expresszióját irányító rekombináns vektor tulajdonságait. A gazdasejt-expressziós rendszer megválasztását nagymértékben megszabja az alkalmazott sejtenyészési eljárások jellege. Az expressziós rendszer megválasztása után meghatározhatjuk az adott termelési módot, ami lehet például szakaszos vagy folyamatos, forgótányéros vagy szifonos, folyékony vagy immobilizált. Különböző fluidágyas bioreaktorokat, üreges rostos bioreaktorokat, forgóhengeres tenyészeteket (roller bottle cultures) vagy kevertetett tankbioreaktorokat alkalmazhatunk. A kiválasztás során figyelembe kell venni a sejtenyészési jellegét. Ezeket a jelen leírásban nem részletezzük, mivel kívül esnek a jelen találmány oltalmi körén. A jelen találmány a kondicionált sejtenyészési-médiumokban, hybridoma és myeloma felülúszókban, antiszérumokban, myeloma felülúszókban és ascites folyadékokban lévő antitestek tisztítására vonatkozik.

Amint azt a fentiekben már említettük, a jelen találmány – egyebek mellett – a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának az antitestmolekulák elválasztására és tisztítására történő alkalmazására vonatkozik. A vizes közegekben lévő hidrofób molekulák önmagukkal asszociálódnak. Ez az asszociáció hidrofób kölcsönha-

tások eredménye. Az olyan makromolekulák, amelyek például a proteinek, a megfelelő hidrofób csoportokon kívül kiterjedt hidrofób foltokkal rendelkeznek a felületükön. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia alapját – legalábbis részben – ezeknek a hidrofób foltoknak a kromatográfiás töltetekhez kapcsolt hidrofób ligandokkal kialakított kölcsönhatása képezi. A mátrixhoz kapcsolt hidrofób ligandot különféle neveken említik, például hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltet, hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás gél vagy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás oszlop. A protein és a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltet közötti kölcsönhatás erőssége nemcsak a proteinen lévő nem poláros és poláros felületek részarányának a függvénye, hanem nagyban befolyásolja a nem poláros felületek eloszlása és a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltet kémiai jellege is.

A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás oszlopok előállításához sokféle kromatográfiás töltetet használnak. A leggyakrabban alkalmazott töltetek közé tartoznak – egyebek mellett – például a következők: agaróz, szilícium-dioxid (kovasav, szilikagél), valamint szerves polimer vagy kopolimer gyanták. A jól alkalmazható hidrofób ligandok magukban foglalják – egyebek mellett – például a következőket: körülbelül 2–8 szénatomos alkilcsoportok, például butil-, propil- vagy oktilcsoport és arilcsoportok, például fenilcsoport. A gélek és oszlopok előállítására szolgáló, hagyományos hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás termékek a következő cégektől, az adott helyen megjelölt termékneveken vásárolhatók meg. Pharmacia LKB AB., Uppsala, Svédország; terméknev: butyl-SEPHAROSE[®], phenyl- vagy butyl-SEPHAROSE[®] CL-4B, butyl-SEPHAROSE[®] FF, octyl-SEPHAROSE[®] FF, valamint phenyl-SEPHAROSE[®] FF. Tosoh Corporation, Tokió, Japán; terméknev: TOYOPEARL ether 650, phenyl 650 vagy butyl 650 (Fractogel). Miles-Yeda, Rehovot, Izrael; terméknev: alkyl-agarose (amelyben az alkilcsoport 2–10 szénatomos). J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok; terméknev: BakerbondWp-Hi-propyl.

A kívánt hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás oszlopokat hagyományos kémiai módszerek alkalmazásával is előállíthatjuk [lásd például: Er-el, Z. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 49, 383. (1972); vagy Ulbrich V. *et al.*, Coll. Czech. Chem. Commun., 9, 1466 (1964)].

A ligandsűrűség fontos paraméter, amelynek értéke nemcsak a kölcsönhatás erősségét, hanem az oszlop kapacitását is jelentősen befolyásolja. A kereskedelemben megvásárolható fenil- vagy oktil-fenil-gélek ligandsűrűsége körülbelül 40 $\mu\text{mol/gél-ml}$. A gélcapacitás értéke a kérdéses konkrét proteintól, a pH-értéktől, a hőmérséklet értékétől, a sótípustól és a koncentrációtól függ, de általában 3 mg/gél-ml és 20 mg/gél-ml közötti nagyságú.

Az ezen a területen jártas szakember egyszerűen ki tudja választani a megfelelő gélét. Általában az alkil-ligandok lánchosszúságának növekedésével nő a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás ligand és a protein kö-

zötti kölcsönhatás erőssége is. A körülbelül 4–8 szénatomos ligandok a legtöbb elválasztás céljára megfelelőek. A fenilcsoport hidrofobicitása körülbelül ugyanolyan, mint egy pentilcsoporté, azonban a szelektivitásban jelentős eltérés lehet a két csoport között, amit elsősorban a fenilcsoport és a proteinen lévő aromás csoportok között fellépő, a pi-pi elektronpályák közötti kölcsönhatások lehetősége magyaráz. A szelektivitás a töltetgyanta kémiai módosításával is befolyásolható.

A proteineknek a hidrofób kölcsönhatási kromatográfias oszlopon történő adszorpcióját elősegítik a nagy sókoncentrációk, de az aktuális koncentrációk jelentős mértékben függenek a protein jellegétől és a választott konkrét hidrofób kölcsönhatási kromatográfias ligandtól. A különféle ionok egy úgynevezett „szolufób” sorba rendezhetők, amelyen belül az egyes ionok helye attól függ, hogy elősegítik-e a hidrofób kölcsönhatásokat (kiszózási effektusok) vagy pedig megtörik-e a víz szerkezetét (kaotrop effektus) és így a hidrofób kölcsönhatások gyengüléséhez vezetnek. A kiszózási hatás szempontjából a kationok a következő, növekvő sorrendben állnak: $Ba^{++} < Ca^{++} < Mg^{++} < Li^{+} < Cs^{+} < Na^{+} < K^{+} < Rb^{+} < NH_4^{+}$. A kaotrop effektus szempontjából az anionok a következő, növekvő sorrendben állnak: $PO_4^{---} < SO_4^{---} < CH_3COO^{-} < Cl^{-} < Br^{-} < NO_3^{-} < ClO_4^{-} < I^{-} < SCN^{-}$.

Ennek megfelelően a kölcsönhatás erősségét befolyásoló hatásuk alapján a sókat a következő sorrendbe állíthatjuk:

$(NH_4)_2SO_4 > Na_2SO_4 > NaCl > NH_4Cl > NaBr > NaSCN$.

Általában körülbelül 0,75 M és körülbelül 2 M közötti ammónium-szulfát-koncentrációkat vagy körülbelül 1 M és körülbelül 4 M közötti nátrium-klorid-koncentrációkat alkalmazunk.

A hőmérséklet értékének a hidrofób kölcsönhatási kromatográfias elválasztásra gyakorolt hatása meglehetősen bonyolult, de általában a hőmérséklet értékének csökkenése gyengíti a kölcsönhatást. Ugyanakkor azonban a hőmérséklet értékének emelésével járó előnyös hatásokat alaposan mérlegelni kell, mivel a hőmérséklet növelése hátrányos hatást gyakorolhat például a protein stabilitására.

A fokozatos vagy gradiens elúciót különféle módon hajthatjuk végre: a) a sókoncentráció változtatásával, b) az oldószer polaritásának változtatásával, vagy c) felületaktív anyagok (detergensek) hozzáadásával. A sókoncentráció csökkentésével az adszorbeálódott proteinek a hidrofobicitás növekvő sorrendjében eluálódnak. A polaritás változtatását oldószerek, például etilén-glikol, propilén-glikol vagy (izo)propil-alkohol hozzáadásával végezhetjük, amelynek eredményeként csökken a hidrofób kölcsönhatások erőssége. A felületaktív anyagok kiszorítják a proteinek a töltetről; a detergenseket a korábbiakban elsődlegesen a membránproteinek tisztításával kapcsolatban használták.

Jóllehet azt már korábban felismerték, hogy a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia önmagában felhasználható a 150 000 molekulatömegű monomer IgG-nek az aggregátumoktól és a hibás speciestől történő elválasztására, azonban – amint azt a fentiekben már emlí-

tettük – a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia nyújtotta lehetőségek különösen előnyösen akkor használhatóak ki, ha a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiát egyéb proteintisztítási eljárásokkal kombinálva alkalmazzuk. Másképpen kifejezve ez azt jelenti, hogy a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiát előnyösen olyan keverékek esetén használjuk, amely keverékeket más proteintisztítási eljárásokkal előzetesen már részlegesen megtisztítottuk. A jelen leírásban alkalmazott „részlegesen tisztított” vagy „részlegesen megtisztított” kifejezés egy olyan proteinkészítményre vonatkozik, amelyben a kérdéses protein legalább 5 tömeg%, még előnyösebben legalább 10 tömeg% és legelőnyösebben legalább 45 tömeg% koncentrációban van jelen. A „keverék” kifejezés azt jelenti, hogy a kívánt monomer IgG antitestmolekula össze van keveredve nemkívánatos szennyezőanyagokkal. A „szennyezőanyagok” összefoglaló név – egyebek mellett – például a következő anyagok közül egyidejűleg egyre vagy többre vonatkozik: immunglobulinaggregátumok, hibás formák, gazdasajtprotein, az előző kromatográfias lépésekből származó visszamaradt anyag, például Protein A (ha alkalmazásra került). A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia felhasználható tehát az immunglobulinproteinek mindenre kiterjedő tisztítási eljárásának részeként is, például az affinitáskromatográfias úton tisztított monoklonális antitestek további tisztítására. Igen hasznosnak bizonyult például, ha a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia alkalmazása előtt egy kondicionált sejtenyészítő médium mintáját előzetesen tisztítottuk. A jelen leírásban alkalmazott „kondicionált sejtenyészítő médium” kifejezés egy olyan sejtenyészítő médiumra vonatkozik, amely elősegíti a sejtnövekedést és/vagy a sejtfenntartást, valamint amely tartalmazza a kiválasztott terméket. Az ilyen médium mintáját a hidrofób kölcsönhatási kromatográfias lépés alkalmazása előtt egy vagy több proteintisztítási lépésben előzetesen tisztítjuk. Első lépésként a mintát *Staphylococcus* Protein A alkalmazásával affinitáskromatografáljuk. Erre a célra igen jól használható a PROSEP-A[®] (BioProcessing Ltd., Nagy-Britannia), amely szabályozott pórusméretű üveghez kovalens kötéssel kapcsolt Protein A-ból áll. További jól alkalmazható Protein A-készítmény a SEPHAROSE[®] Fast Flow (Pharmacia AB., Uppsala, Svédország) és a TOYOPEARL 650M Protein A (Toso Haas Co., Tokió, Japán). Anionos vagy kationos kromatográfias töltetek előállítására érdekében mátrixokhoz különféle anionos vagy kationos szubsztituenseket kapcsolhatunk. Az anioncserélő szubsztituensek közé tartozik – egyebek mellett – például a (diethyl-amino)-etilcsoport (DEAE), a kvaterner amino-etilcsoport (QAE) és a kvaterner amincsoport (Q). A kationcserélő szubsztituensek közé tartozik – egyebek mellett – például a karboxi-metil-csoport (CM), a szulfo-etil-csoport (SE), a szulfo-propil-csoport (SP), a foszfátcsoport (P) és a szulfonátcsoport (S). A cellulózos ioncserélő gyanták közé tartozik a DE23, a DE32, a DE52, a CM-23, a CM-32 és a CM-52 (valamennyi: Whatman Ltd., Maidstone, Kent, Nagy-Britannia). Ismertek SEPHADEX[®]-alapú és térhálóított ioncserélők is. Ilyen pé-

dául a DEAE-, QAE-, CM- és SP-SEPHADEX[®], a DEAE-, QAE-, CM- és SP-SEPHAROSE[®], valamint a SEPHAROSE[®] Fast Flow (valamennyi: Pharmacia AB., Uppsala, Svédország). Felhasználhatók továbbá az etilén-glikol/metakrilát kopolimerek DEAE- és CM-származékai is, amilyen például a TOYOPEARL DEAE-650S vagy M, valamint a TOYOPEARL CM-650S vagy M (valamennyi: Toso Haas CO., Philadelphia, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok). Tekintettel arra, hogy az ioncserélő töltetről végzett elúció szokásosan só hozzáadásával jár együtt, és mivel – amint azt a fentiekben már említettük – nagyobb sókoncentrációk előnyösen befolyásolják a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás elválasztást, egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépésnek az ioncserés kromatográfiás lépés vagy egyéb, sóval végzett tisztítási lépés utáni beépítése különösen előnyös. További tisztítási eljárásokat is alkalmazhatunk, amilyenek – egyebek mellett – például a következők: további ioncserés kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia, vírusos inaktiválás, betöményítés és fagyaszti szarítás.

Csak illusztrációs céllal a találmány szerinti eljárást felhasználtuk az IgG izotípus több antitestjének a tisztítására. Közlebbbről a találmány szerinti eljárással megtisztítottunk egy, a WO 92/04381 számon közzétett, PCT/GB91/01554 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben ismertetett és RSV-fertőzés kezelésére szolgáló humanizált antitestet (ezt az anyagot a továbbiakban „RSHZ-19” antitestként hivatkozunk), valamint egy, a WO 93/02108 számon közzétett, PCT/US92/06194 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben ismertetett és a CD4-antigénnel specifikusan reaktív kiméra antitestet (ezt az anyagot a továbbiakban „CH-CD4” antitestként hivatkozunk). Az RSHZ-19 és a CH-CD4 kiméra antitest előállítására szolgáló rekombináns rendszerek összeállításának részletei az előbbieken hivatkozott szabadalmi dokumentumokban található, itt csak rövid összefoglalásukat ismertetjük.

Egy, az RSHZ-19-et kódoló szekvenciát tartalmazó expressziós plazmidot pSV2dhfr-rel egy dhfr-t igénylő kínaihörség-petefészek sejtvonalba (CHODUXBII) kotranszfectáltuk. A transzfectiót tenyésztőmédiumban hajtottuk végre, és a következő helyen ismertetett kalciumkoprecipitáció/glicerinsokk eljárást alkalmaztuk: DNA Cloning, D. M. Glover ed. (Chap. 15, C. Gorman). A transzfectió után (és a szelekciós eljárás előtt) a sejteket (a fentiekben ismertetett) tenyésztési körülmények között 46 órán keresztül tenyésztőmédiumban tartottuk.

A szelekciót és a koamplifikációs eljárást lényegében a következő helyen ismertetetteknek megfelelően végeztük: R. J. Kaufman *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5., 1750–1759. (1985). A transzfectió után 46 órával a sejtek feletti médiumot szelektív médiumra [MEM ALPHA (041–02571), 1 tömeg% glutamin, 1 tömeg% pen/strep (043–05070 és dializált magzatborjúszerum (220–6300AJ (Gibco, Paisley, Nagy-Britannia))] cseréltük. A sejteket 8–10 napon keresztül a szelektív médiumban tartottuk, amíg megjelentek a dhfr⁺-telepek. Amikor a telepek megszilárdultak, a sejtek feletti médiumot methotrexate-ot (A6770, Sigma Chemical

Company, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) tartalmazó szelektív médiumra cseréltük. A methotrexate-koncentráció értéke kezdetben 0,02 μM volt, amelyet fokozatosan 5 μM -ra emeltünk. Az amplifikációs eljárás ideje alatt a növekvő sejtekről nyert tenyésztőközeg-mintákat az RSHZ-19-termelésre nézve humán IgG-vel vizsgáltuk. A találmány szerinti tisztítási eljárás céljaira bármilyen antitestet kiválasztó rekombináns sejt vonalat felhasználhatunk, nincs szükség konkrét, meghatározott sejt vonal alkalmazására.

Az RSHZ-19 termelésére alkalmas transzfectált CHO-sejt vonalat különféle sejttenyésztési módszerek alkalmazásával tenyészthetjük. A találmány szerinti tisztítási eljárás szempontjából a konkrét tenyésztési eljárás nem kritikus.

Amint azt a fentiekben már említettük, a konkrét termelőrendszer és a konkrét sejttenyésztési eljárás a jelen találmány oltalmi körén kívül esik. A fentiekben bemutatott rendszer és eljárás csak egy az ezen a területen jártas szakember számára ismert többféle lehetőség közül, amely rendszert és eljárást csak illusztratív jelleggel ismertettünk. A jelen találmány tulajdonképpeni tárgyát képező tisztítási eljárás rutinszerű módosításokkal a legkülönbözőbb antitestek vagy antitestszerű proteinek esetén is alkalmazható függetlenül attól, hogy az antitesteket vagy az antitestszerű proteineket milyen módszerrel termelték vagy tenyésztették. Például a találmány szerinti eljárással egy CD4 kiméra monoklonális antitestet is megtisztítottunk.

A találmány szerinti eljárás végrehajtása útján nyert tisztított antitestek a következő jellemzőkkel rendelkeznek: 1. 97 tömeg%-nál nagyobb antitestprotein-koncentráció; 2. 4 °C hőmérsékleten legalább három hónapra keresztül stabilak a proteolitikus degradációval szemben; 3. alacsony (<0,1 E.U./protein-mg) endotoxinmennyiség; 4. alacsony (<1 pg/protein-mg) DNS-mennyiség; 5. 5 tömeg%-nál kisebb nem antitestprotein-koncentráció és 6. vírusosan inaktívak. A következő példák a találmány további illusztrációját szolgálják; a példák nem korlátozzák a szabadalmi igénypontok által meghatározott oltalmi kört.

I. példa

Bevezetés

Az alábbiakban ismertetett eljárást egy respiratory syncytial vírus (RSV) elleni monoklonális antitest izolálására és tisztítására fejlesztettük ki. Ez az antitest egy CHO sejtekben expresszált „humanizált” IgG; a tenyésztést kevertetett tankbioreaktorban végeztük. Az antitest teljesebb leírása a WO 92/04381 számon közzétett, PCT/GB91/01554 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben található meg (ezt az antitestet a továbbiakban „RSHZ-19” antitestként hivatkozunk a jelen leírásban). Az eljárást úgy terveztük meg, hogy az RSHZ-19-et 95%-nál nagyobb tisztaságban nyerjük annak révén, hogy a gazdasejtből, a sejttenyésztő médiumból vagy az egyéb nyersanyagokból származó szennyezőanyagokat eltávolítjuk. Az eljárás a legelőnyösebb megoldás értelmében három tisztítási lépést (Protein A-affinitáskromatográfia, kationos ioncserés

kromatográfia és hidrofób kölcsönhatási kromatográfia), két vírusinaktívációs lépést, valamint a terméknek egy választott végső pufferbe történő átvitele érdekében egy diafiltrálási lépést tartalmaz (lásd az 1. ábrát). Valamennyi lépést szobahőmérsékleten (18–25 °C) hajtjuk végre. A pufferek mindegyikét WFI-vel állítjuk elő és a felhasználás előtt 0,2 µm-es szűrőn vagy egy 10 000 MWCO membránon szűrjük keresztül. A pufferkészítményeket az alábbi 1. táblázatban ismertetjük. A 2., 4., 6. és 8. táblázat – az előbbi sorrendnek megfelelően – az IA., IB., IC. és ID. példa során alkalmazott oszlopok paramétereit foglalja össze. A 3., 5., 7. és 9. táblázatban – az előbbi sorrendnek megfelelően – az IA., IB., IC. és ID. példa tisztítási eredményeit összegezzük.

Az eljárás első lépése (Protein A-affinitáskromatográfia ProSep A oszlopon) különböző mennyiségű sejtmentes tenyésztőfolyadékkal (cell-free culture fluid, CCF) gyorsan ciklizálható, és az oszlopkapacitás a ProSep A 1 literére vonatkoztatva körülbelül 15 gramm RSHZ–19. Például 400–500 g IgG-t tartalmazó 500 liter CCF körülbelül 5–6 ciklusban feldolgozható. Az eljárás későbbi lépései [kationcserés kromatográfia (Cation Exchange Chromatography, CEC) és hidrofób kölcsönhatási kromatográfia (HIC)] ciklusonként hozzávetőleg 130–140 gramm RSHZ–19 feldolgozására alkalmasak. Ennek megfelelően 400–500 g IgG-t tartalmazó 500 liter tenyészetet a ProSep A tölteten végzett megkötés után három későbbi ciklusban dolgozunk fel.

Igazolt tény, hogy a hidrofób kölcsönhatási kromatográfia eltávolítja a Protein A-oszlopról az elúció ideje alatt leszakadt Protein A-t (lásd: IA–D. példa). Ezen túlmenően a hidrofób kölcsönhatási kromatográfias oszlopon az IgG-aggregátumok is eltávolíthatók, amint az az IC. és az ID. példában látható.

Az eljárás leírása tetszés szerinti méretekhez alkalmazható; a felsorolt lineáris áramlási sebességek függetlenek az oszlopátmértől, a feltöltési (loading) arányok egységnyi oszloptérfogatra vonatkoztatott tömegértékek. A példák 1 grammos, 40 grammos és 125 grammos tételekkel végzett műveletekre és kinyerésekre vonatkoznak (IA–ID. példa).

A tisztítási eljárás leírása

A sejteknek a tenyészetből történő eltávolítása

A tenyésztőfolyadék leszűreteléhez a sejteket egy 65 µm-es szűrővel ellátott tangenciális áramlású mikroszűrőberendezés (Prostak) alkalmazásával távolítjuk el. A terméket a szűrletben (permeátumban) nyerjük. Kis térfogatú tenyészet esetén centrifugálást is alkalmazhatunk.

A Protein A-val végzett affinitáskromatográfias megkötés

Az IgG-t előzetesen PBS-sel ekvibrált ProSep A (BioProcessing Ltd.) oszlopon végzett adszorpciós kromatográfiával nyerjük ki a CCF-ből. A médiumot legfeljebb 1000 cm/óra áramlási sebességgel, az oszloptérfogat 1 literére vonatkoztatva legfeljebb 15 gramm IgG feltöltési arány mellett visszük fel az oszlopra. Az oszlop feltöltése után az oszlopot legalább háromszoros

oszloptérfogatnyi, 0,1 M glicint tartalmazó PBS-sel mossuk. Az RSHZ–19-et alacsony pH-értékű pufferrel eluáljuk, amelynek során hozzávetőleg háromszoros oszloptérfogatnyi elúciós puffert alkalmazunk.

5 A Protein A-kromatográfia eltávolítja a sejtekből és a médiumból származó szennyezőanyagok (különösen az átáramló folyadékban és a mosófrakciókban lévő protein és DNS) nagy részét, és a további eljárási lépésekhez betöményíti az RSH–19-et az elúciós puffertben.

A savas pH-n végzett vírusinaktíválás (adott esetben végrehajtható lépés)

10 A Protein A-oszlop eluátumát összegyűjtjük és 2,5 M sósavoldat hozzáadásával pH 3,5 érték eléréséig megsavanyítjuk. Az oldatot áthelyezzük egy második edénybe, majd a vírusok inaktíválása érdekében a pH értékét legalább 31 percen keresztül 3,5-ön tartjuk. Ezt követően Tris-puffer hozzáadásával a pH értékét visszaállítjuk 5,5-re. Az így nyert oldatot előbb egy előszűrőn (Millipore Polygard vagy ezzel ekvivalens), majd egy sterilizált 0,2 µm-es szűrőn (Millipore Millipak vagy ezzel ekvivalens) átszűrjük, ezt követően pedig 4 °C hőmérsékleten steril tartályokban tároljuk vagy lefagyaszthatjuk és –70 °C hőmérsékleten tartjuk.

25 A 3,5-ös pH-n végzett kezelés biztosítja a vírusok inaktíválódását, míg az 5,5-ös pH-értékre történő beállítás előkészíti az oldatot a kationcserés kromatográfiához (CEC). Kivánt esetben a 3,5-ös pH-értéken végzett kezelést elhagyható.

Kationcserés kromatográfia

30 A megfelelő pH-n végzett kezeléssel inaktívált Protein A-eluátumot CM SEPHAROSE FF (Pharmacia AB., Uppsala, Svédország) oszlopon kationcserés kromatográfiával tovább tisztítjuk. A mintát 150 cm/óra áramlási sebességgel, a CM SEPHAROSE 1 literére vonatkoztatva legfeljebb 20 gramm proteinfeltöltési arány mellett visszük fel az ekvibrált oszlopra. Az oszlop feltöltése után az oszlopot 3–5-szörös oszloptérfogatnyi ekvibrációs pufferrel mossuk. A terméket 3–5-szörös oszloptérfogatnyi elúciós pufferrel eluáljuk.

A kationcserés kromatográfia eltávolítja a protein és a nem protein jellegű szennyezőanyagokat.

A guanidinnel végzett vírusinaktíválás

45 A kationcserés eluátumot félszeres térfogatú guanidin-törzsoldat lassú, keverés közben végzett hozzáadásával beállítjuk körülbelül 2,0 M guanidin-hidroklorid koncentrációra. A reagens beadagolásának sebességét úgy választjuk meg, hogy a beadagolás körülbelül 5–15 percig tartson. Az oldatot áthelyezzük egy második edénybe, majd a vírusinaktíválás végrehajtása érdekében 30 percen keresztül állni hagyjuk. Ezt követően keverés közben lassan azonos térfogatú ammónium-szulfát-törzsoldatot adunk az oldathoz, azonnal végrehajtuk a hidrofób kölcsönhatási kromatográfias lépést. A reagens beadagolásának sebességét úgy választjuk meg, hogy a beadagolás körülbelül 5–15 percig tartson.

60 A guanidines kezelés egy második vírusinaktívációs lépést biztosít, ha egy savas inaktívációs lépést alkalmazunk, és az ammónium-szulfátos beadagolás után

az RSHZ-19-et oldható formában tartjuk. Az ammónium-szulfát beadagolása a guanidin hígítására szolgál és előkészíti az oldatot a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépéshez.

A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia

A guanidinnel kezelt oldatot oly módon tisztítjuk tovább, hogy az oldatot felvisszük egy ekvibrációs pufferrel előzetesen ekvibrált TOYOPEARL Phenyl-650M töltetet tartalmazó hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás oszlopra. A guanidinnel kezelt oldatot 150 cm/óra áramlási sebességgel, a TOYOPEARL Phenyl-650M töltet 1 literére vonatkoztatva legfeljebb 20 gramm proteinfeltöltési arány mellett visszük fel az oszlopra. Az oszlop felöltése után az oszlopot 3–5-szörös oszloptérfogatnyi ekvibrációs pufferrel mossuk. Ammónium-szulfát lineárisan csökkenő gradienst alkalmazunk 100–150 cm/óra áramlási sebességgel, és az RSHZ-19-et egyetlen fő csúcsként nyerjük, míg a szennyezőanyagok a gradiensben később eluálódnak. A gradiens esése körülbelül 20 oszloptérfogat, 100% ekvibrációs pufferrel kezdve és 100% gradiens pufferrel (1,3→0 M ammónium-szulfát) befejezve. A csúcsához tartozó frakciókat a maximális csúcsabszorbancia 20%-áig csökkenő abszorbanciáig gyűjtjük össze; ezt követően a termékfrakciók gyűjtését befejezzük. A gradiens végét követően az oszlopot körülbelül háromszoros oszloptérfogatnyi lemosó- (strip) pufferrel mossuk.

A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépés eltávolítja a további protein és nem protein jellegű szennyezőanyagokat, különösen a Protein A-t, az IgG-aggregátumokat és a gazdasejt DNS-t.

A betöményítés, a diafiltrálás és a végső szűrés

A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás eluátumot egy 30 000 MWCO (cut-off) szűrővel ellátott, tangenciális áramlású ultraszűrőberendezés (például egy Millipore CUF) alkalmazásával körülbelül 10 milligramm/milliliter koncentrációra töményítjük, egy megfelelő pufferbe diafiltráljuk, majd egy sterilizált 0,2 µm-es (Millipore Millipak vagy ezzel ekvivalens) szűrőn át sterilizált tartályokba szűrjük.

Az eljárás közben végrehajtott vizsgálatok

Az eljárás ideje alatt bizonyos eljárási intermediereket vizsgálunk, például OD280 alkalmazásával vagy Bradford-vizsgálattal mérjük a teljes proteinkoncentrációt, továbbá az RSHZ-19 koncentrációját HPLC vagy nátrium-szulfát–poliakrilamid gélelektroforézis (SDS–PAGE) alkalmazásával mérjük. Az aggregálódott terméket méretkizárásos HPLC alkalmazásával, TSK3000 SWXL tölteten határozzuk meg, míg a Protein A-maradékot ELISA alkalmazásával mérjük.

A frakciók összeöntésének kritériumai

A Protein A-oszlopról és a kationcserés lépésből származó eluátumfrakciókat az UV-detektálással nyert kromatogram alapján öntjük össze, és az egész csúcsot összegyűjtjük. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépésben kapott eluátumot az UV-detektálással nyert kromatogram alapján önsztjük össze, és a csúcsához tartozó frakciókat addig gyűjtjük, amíg a csúcs le szálló ágain a csúcsmaximum 20%-át érjük el. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfia utolsó frakciói tartal-

mazzák a Protein A és az aggregálódott IgG-k legnagyobb részét.

I. táblázat
Pufferkészítmények

A puffer neve	A puffer összetétele
PBS	20 mM nátrium-foszfát, 150 mM nátrium-klorid, pH 7
PBS/glicin	PBS+0,1 M glicin
ProSep elúciós puffer	25 mM citrát, pH 3,5
CM SEPHAROSE ekvibrációs puffer	10 mM citrát, pH 5,5
CM SEPHAROSE elúciós puffer	40 mM citrát, 100 mM nátrium-klorid, pH 6
Guanidin törzsoldat	6 M guanidin-hidroklorid, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7
2,6 M ammónium-szulfát-törzsoldat	2,6 mM ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7
2,0 M ammónium-szulfát-törzsoldat	2,0 mM ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7
Phenyl-650 ekvibrációs puffer	1,3 mM ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7
Phenyl-650 gradiens-puffer	50 mM nátrium-foszfát, pH 7
Butyl-650 ekvibrációs puffer	1,0 mM ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7
Butyl-650 gradiens-puffer	50 mM nátrium-foszfát, pH 7
Hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lemosó-puffer	0,2 M nátrium-hidroxid

IA. példa: Az RSHZ-19 tisztítása 1 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl-650M alkalmazásával

Egy 5 literes (20 cm átmérőjű és 16 cm hosszúságú) ProSep A affinitáskromatográfiás oszlopot 5,2 liter/perc áramlási sebesség mellett PBS-sel (lásd: 1. táblázat) ekvibráltunk. Egy literenként 0,8 g RSHZ-19 monoklonális antitestet tartalmazó kondicionált sejtenyészítő médium 100 liternyi mennyiségét a fentiekben ismertetetteknek megfelelően mikroszűréssel szűrtük, majd 5,2 liter/perc áramlási sebesség mellett feltöltöttük az oszlopra. A feltöltés befejezése után 5,2 liter/perc áramlási sebesség mellett körülbelül 15 liter PBS/glicint vittünk fel az oszlopra. Az IgG-t 15–20 liter ProSep A elúciós puffer alkalmazásával eluáltuk. A nem kötött csúcsokat és az elúciós csúcsot tartalmazó frakciókat HPLC alkalmazásával megvizsgáltuk az IgG-tartalomra nézve. Az eluátum mennyisége körülbe-

lül 15 liter volt, amely literenként hozzávetőleg 5 milligramm proteint tartalmazott.

Az elúció után a minta pH-ját 2,5 M sósavoldat hozzáadásával azonnal 3,5-re állítottuk be, az oldatot körülbelül 30 percen keresztül állni hagytuk, majd hozzávetőleg 350 ml 1 M Tris-bázis hozzáadásával a pH-értékét 5,5-re állítottuk be. A pH 5,5-re történő beállításával végzett semlegesítés után a mintát előbb egy 0,1 µm-es Polygard CR szűrőn, majd egy steril 0,2 µm-es Millipak 200 szűrőn keresztül steril tartályba szűrtük. A szűrletet 4 °C hőmérsékleten tároltuk. Megvizsgáltuk a szűrlet mintáit HPLC alkalmazásával az IgG-tartalomra nézve, valamint a 280 nm hullámhosszon mért abszorbancia alapján a teljes proteintartalomra nézve. ELISA-eljárással a minták Protein A-tartalmát is analizáltuk. Ezt a 3,5-ös pH-értéken kezelt és szűrt ProSep A-eluátumot alkalmaztuk az IA., IB. és IC. példában a CM SEPHAROSE oszlop feltöltésére.

A 3,5-ös pH-értéken kezelt és szűrt ProSep A-eluátumot 38 ml/perc áramlási sebességgel közvetlenül felvittük egy 220 milliliteres (4,4 cm átmérőjű és 15 cm hosszúságú), előzetesen CM ekvibrációs pufferrel ekvibrált CM SEPHAROSE FF oszlopra. A feltöltés befejezése után 38 ml/perc áramlási sebesség mellett hozzávetőleg 700 ml CM ekvibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t 38 ml/perc áramlási sebességű CM elúciós puffer alkalmazásával eluáltuk. Az IgG körülbelül egy ágytérfogathoz elúciós puffer átfolyása után jött le az oszlopról. CM SEPHAROSE-eluátumként a teljes csúcstól összegyűjtöttük. A nem kötött csúcsok frakcióit, az eluátumot és a lemosófrakciókat összegyűjtöttük, majd a fentiekben ismertetetteknek megfelelően vizsgáltuk az IgG-tartalmat, a teljes proteintartalmat és a Protein A-tartalmat. Az eluátum mennyisége körülbelül 160 milliliter volt, amely milliliterenként hozzávetőleg 12 milligramm proteint tartalmazott. Ezt a CM SEPHAROSE-eluátumot két azonos, körülbelül 80 ml-es részre osztottuk, és ezeket használtuk fel az IA. és IB. példában a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiai oszlop feltöltésére.

A CM SEPHAROSE-eluátum 80 milliliternyi mennyiségéhez egyenletes keverés közben lassan hozzáadtunk összesen 40 ml guanidin törzsoldatot. Így a vírusok inaktiválásához az oldat guanidinkoncentrációját 2 M-ra állítottuk be. A guanidinnal kezelt oldathoz keverés közben hozzáadtunk összesen 120 ml 2,6 M ammónium-szulfát-törzsoldatot. Az így nyert oldat guanidinkoncentrációja 1 M, ammónium-szulfát-koncentrációja 1,3 M volt. Az ammónium-szulfáttal kezelt oldatot felvittük egy 80 milliliteres (3,2 cm átmérőjű és 10 cm hosszúságú), előzetesen Phenyl ekvibrációs pufferrel ekvibrált TOYOPEARL Phenyl-650M oszlopra. A kísérlet során az áramlási sebesség értéke 20 ml/perc volt. A feltöltés befejezése után az oszlopot körülbelül 350 ml Phenyl ekvibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t lineáris gradiens alkalmazásával eluáltuk, amelyet 85% ekvibrációs/15% gradienspufferrel kezdtünk, majd 18–19 oszloptérfogathoz mennyiség után 0% ekvibrációs/100% gradienspufferrel fejeztünk be. Ennek megfelelően a kezdeti ammónium-szulfát-koncentráció hozzávetőleg 1,1 M, míg a befejezési ammónium-szulfát-koncentráció 0 M volt. A gradiens változása az elúciós pufferben oszloptérfogatonként körülbelül 4,7%-os növekedés volt, vagy másképpen kifejezve, oszloptérfogatonként –0,061 M ammónium-szulfát volt. Az IgG körülbelül 7 oszloptérfogathoz mennyiség után kezdett az oszlopról eluálódni, és az IgG elúciója hozzávetőleg 13 oszloptérfogathoz mennyiség után fejeződött be (ennek során az ammónium-szulfát-koncentráció körülbelül 0,7 M-ról körülbelül 0,3 M-ra csökkent). Az eluált frakciókat az UV-elnyelés alapján addig gyűjtöttük össze, amíg a csúcs leszálló ágain az abszorbancia értéke a csúcsmagasság 20%-át el nem érte. Ezt követően a további eluátumokat egy másik edénybe gyűjtöttük (zárófrakció). A gradiens végét követően az oszlop regenerálása érdekében körülbelül 250 ml hidrofób kölcsönhatási kromatográfiai lemosópuffert vittünk fel az oszlopra. A Phenyl oszloptöltet nem kötött frakcióit, eluátumát, zárófrakcióját és a lemosópuffer frakcióját a fentiekben ismertetetteknek megfelelően vizsgáltuk az IgG-tartalomra, a teljes proteintartalomra és a Protein A-tartalomra nézve. Az eluátum mennyisége körülbelül 300 milliliter volt, amely milliliterenként hozzávetőleg 2,4 milligramm proteint tartalmazott.

A 2. táblázatban foglaltuk össze ennek a példának az oszlopparamétereit. Az egyes lépések termék- és proteinkinyerési adatait a 3. táblázatban tüntetjük fel; ugyanitt adjuk meg a Protein A-tartalom értékeit is, amelyeket (nanogramm Protein A)/(milligramm IgG) (ng/mg) egységben fejezünk ki. Amint az a 3. táblázat adataiból látható, a Phenyl-650M tölteten végzett hidrofób kölcsönhatási kromatográfia eredményeként a Protein A mennyisége körülbelül negyedrésszére csökkent, ugyanakkor a kihozatal hozzávetőleg 94%-os értékű volt.

2. táblázat

Oszlopparaméterek 1 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl-650M alkalmazása esetén

Lépés	Oszloptérfogathoz (liter)	Oszlop átmérő × hossz (cm)	Feltöltési arány	Áramlási sebesség	
				(cm/óra)	(ml/perc)
ProSep A	5,0	20 × 16	16,0 g/liter ágytérfogathoz	1000	5200
CM SEPHAROSE FF	0,22	4,4 × 15	9,1 g/liter ágytérfogathoz	150	38
Phenyl-650M	0,08	3,2 × 10	10,4 g/liter ágytérfogathoz	150	20

3. táblázat

Az IA. példa szerinti tisztítás összefoglalása
(1 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl-650M alkalmazása)

Lépés	Térfogat (liter)	Összes RSHZ-19 ^a (gramm)	Összes protein ^b (gramm)	A lépés hozama (%)	Protein A ^c (ng/mg)
Sejtmentes tenyésztőfolyadék	100	80,3	nincs adat	–	0
ProSep A-eluátum	15,8	73,8	80,4	92	20,2
CM SEPHAROSE ^d -feltöltés	(0,4) ^d	(1,87) ^d	(2,04) ^d		
CD SEPHAROSE-eluátum	0,16	2,01	1,88	100	14,5
Phenyl-650M ^d -feltöltés	(0,21) ^d	(0,72) ^d	(0,83) ^d		
Phenyl-650M-eluátum	0,31	0,68	0,73	94	3,5
Phenyl zárófrakció	0,59	0,075	0,10	–	133 ^e
Összesített kihozatal (%)				86	

^a HPLC-vel

^b abszorbancia 280 nm-nél; $1,27 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

^c ELISA alkalmazásával

^d Az előző oszlopról nyert eluátumnak csak egy részét vittük tovább (lásd a leírást).

^e A Protein A-csödlöges a zárófrakcióba áramlik.

IB. példa: Az RSHZ-19 tisztítása 1 grammos mennyiség és TOYOPEARL Butyl-650M alkalmazásával

Ebben a kísérletben ugyanazt a CM SEPHAROSE-eluátumot alkalmaztuk, mint amelyet az IA. példában ismertettünk, azonban a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépést TOYOPEARL Phenyl-650M töltet helyett TOYOPEARL Butyl-650M töltetet alkalmazva hajtottuk végre. A CM SEPHAROSE-eluátum előállítását a fenti IA. példában ismertetjük.

A CM SEPHAROSE-eluátum 80 milliliternyi mennyiségéhez egyenletes keverés közben lassan hozzáadtunk összesen 40 ml guanidin törzsoldatot. Így a vírusok inaktiválásához az oldat guanidinkoncentrációját 2 M-ra állítottuk be. A guanidinnel kezelt oldathoz keverés közben hozzáadtunk összesen 120 ml 2,0 M ammónium-szulfát törzsoldatot. Az így nyert oldat guanidinkoncentrációja 1,0 M, ammónium-szulfát-koncentrációja ugyancsak 1,0 M volt. Az ammónium-szulfáttal kezelt oldatot felvittük egy 80 milliliteres (3,2 cm átmérőjű és 10 cm hosszúságú), előzetesen Butyl ekvibrációs pufferrel ekvibrált TOYOPEARL Butyl-650M oszlopra. A kísérlet során az áramlási sebesség értéke mindvégig 20 ml/perc volt. A feltöltés befejezése után az oszlopot körülbelül 350 ml Butyl ekvibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t lineáris gradiens alkalmazásával eluáltuk, amelyet 65% ekvibrációs/35% gradienspufferrel kezdtünk, majd 12–13 oszloptérfogatnyi mennyiség után 20% ekvibrációs/80% gradienspufferrel fejeztünk be. Ennek megfelelően a kezdeti ammónium-szulfát-koncentráció hozzávetőleg 0,65 M, míg a befejezési ammónium-szulfát-koncentráció 0,2 M volt. A gradiens változása az elúciós pufferben oszloptérfogatonként körülbelül 3,3%-os növekedés volt, vagy másképpen kifejezve, oszloptér-

fogatonként –0,033 M ammónium-szulfát volt. Az IgG körülbelül 2 oszloptérfogatnyi gradiensmennyiség után kezdett az oszlopról eluálódni, és az IgG elúciója hozzávetőleg 9 oszloptérfogatnyi gradiensmennyiség után fejeződött be (ennek során az ammónium-szulfát-koncentráció körülbelül 0,58 M-ról körülbelül 0,35 M-ra csökkent). Az eluált frakciókat az UV-elnyelés alapján addig gyűjtöttük össze, amíg a csúcs leszálló ágain az abszorbancia értéke a csúcsmagasság 10%-át el nem érte. Ezt követően a további eluátumokat egy másik edénybe gyűjtöttük (zárófrakció). A gradiens végét követően körülbelül 250 ml Butyl gradienspuffert vittünk fel az oszlopra, így egy kis csúcs eluálódott, amelyet szintén összegyűjtöttünk. Ezt követően az oszlop regenerálása érdekében körülbelül 250 ml hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lemosópuffert vittünk fel az oszlopra. A Butyl oszloptöltet nem kötött frakcióit, eluátumát, zárófrakcióját és a lemosópuffer frakcióját a fentiekben ismertetetteknek megfelelően vizsgáltuk az IgG-tartalomra, a teljes proteintartalomra és a Protein A-tartalomra nézve. Az eluátum mennyisége körülbelül 400 milliliter volt, amely milliliterenként hozzávetőleg 1,5 milligramm proteint tartalmazott.

A 4. táblázatban foglaltuk össze ennek a példának az oszlopparamétereit. Az egyes lépések termék- és proteinkinyerési adatait az 5. táblázatban tüntetjük fel; ugyanitt adjuk meg a Protein A-tartalom értékeit is, amelyeket (nanogramm Protein A)/(milligramm IgG) (ng/mg) egységben fejezünk ki. Jóllehet az IgG hozama kisebb, mint az IA. példában (79% a 95%-kal szemben), a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépésben alkalmazott Butyl-650M hatására a Protein A-tartalom körülbelül a huszadrészére csökkent.

4. táblázat

Oszlopparaméterek 1 grammos mennyiség és TOYOPEARL Butyl-650M alkalmazása esetén

Lépés	Oszloptérfogat (liter)	Oszlop átmérő × hossz (cm)	Feltöltési arány	Áramlási sebesség	
				(cm/óra)	(ml/perc)
CM SEPHAROSE FF	0,22	4,4 × 15	9,1 g/liter ágytérfogat	150	38
Butyl-650M	0,08	3,2 × 10	10,4 g/liter ágytérfogat	150	20

5. táblázat

Az IB. példa szerinti tisztítás összefoglalása
(1 grammos mennyiség és TOYOPEARL Butyl-650M alkalmazása)

Lépés	Térfogat (liter)	Összes RSHZ-19 ^a (gramm)	Összes protein ^b (gramm)	A lépés hozama (%)	Protein A ^c (ng/mg)
Sejtmentes tenyésztőfolyadék	100	80,3	nincs adat	–	0
ProSep A-eluátum	15,8	73,8	80,4	92	20,2
CM SEPHAROSE ^d -feltöltés	(0,4) ^d	(1,87) ^d	(2,04) ^d		
CD SEPHAROSE-eluátum	0,16	2,01	1,88	100	14,5
Butyl-650M ^d -feltöltés	(0,21) ^d	(0,76) ^d	(0,86) ^d		
Butyl-650M-eluátum	0,41	0,60	0,62	79	0,7
Butyl-zárófrakció	0,40	0,03	0,03	–	31,4 ^{e,f}
Butyl-lemosófrakció	0,53	0,10	0,10	–	nincs adat ^g
Összesített kihozatal (%)				73	
Tömegmérleg (a feltöltés %-ában)				95	

^a HPLC-vel^b abszorbancia 280 nm-nél; 1,27 ml · mg⁻¹ · cm⁻¹^c ELISA alkalmazásával^d Az előző oszlopról nyert eluátumnak csak egy részét vittük tovább (lásd a leírást).^e A Protein A-elsődleges a zárófrakcióba áramlik.^f A zárórész a felvitt anyag 3%-át tartalmazza.^g A lemosófrakciók a feltöltött protein 13%-át tartalmazzák.

IC. példa: Az RSHZ-19 tisztítása 40 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl-650M alkalmazásával

Ebben a kísérletben ugyanazt a ProSep A-eluátumot alkalmaztuk, mint amelyet az IA. példában ismertettünk. Az ezt követő lépéseket alkalmassá tettük 40 gramm protein befogadására. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépést TOYOPEARL Phenyl-650M töltet alkalmazásával hajtottuk végre. 7,8 liter, pH 3,5-ön kezelt és szűrt ProSep A-eluátumot közvetlenül feltöltöttünk egy 4,2 literes (25 cm átmérőjű és 8,5 cm hosszúságú), előzetesen 1,2 liter/perc áramlási sebesség mellett CM ekvibrációs pufferrel ekvibrált CM SEPHAROSE FF töltet tartalmazó oszlopra. A feltöltés befejezése után az oszlopot 1,2 liter/perc áramlási sebesség mellett körülbelül 8 liter CM ekvibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t 1,2 liter/perc áramlási sebességű CM elúciós puffer alkalmazásával eluáltuk. Az IgG körülbelül egy ágytérfogatnyi elúciós puffer áthaladása után jött le az oszlopról. CM SEPHAROSE-eluátumként az egész csúcstól össze-

gyűjtöttük. A CM által meg nem kötött frakciókat és az eluátumot összegyűjtöttük, majd a fentiekben ismertetetteknek megfelelően vizsgáltuk az IgG-tartalmat, a teljes proteintartalmat és a Protein A-tartalmat. Az eluátum mennyisége körülbelül 5,7 liter volt, amely milliliterenként hozzávetőleg 6–7 milligramm proteint tartalmazott.

A CM SEPHAROSE-eluátum 5,6 liternyi mennyiségéhez egyenletes keverés közben lassan hozzáadtunk összesen 2,8 liter (3,2 kg) guanidin törzsoldatot. Így a vírusok inaktíválásához az oldat guanidinkoncentrációját 2 M-ra állítottuk be. A guanidinnal kezelt oldathoz keverés közben hozzáadtunk összesen 8,3 liter (9,7 kg) 2,6 M ammónium-szulfát-törzsoldatot. Az így nyert oldat végtérfogata 16,7 liter, guanidinkoncentrációja 1,0 M, valamint ammónium-szulfát-koncentrációja 1,3 M volt. Az ammónium-szulfáttal kezelt oldatot felvittük egy 4,6 literes (18 cm átmérőjű és 18 cm hosszúságú), előzetesen Phenyl ekvibrációs pufferrel ekvibrált TOYOPEARL Phenyl-650M oszlopra. A kísérlet során az áramlási sebesség értéke mindvégig 0,5–0,6 li-

ter/perc volt. A feltöltés befejezése után az oszlopot körülbelül 14 liter Phenyl ekvibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t lineáris gradiens alkalmazásával eluáltuk, amelyet 100% ekvibrációs pufferrel kezdtünk, majd 20 oszloptérfogatnyi mennyiség után 100% gradienspufferrel fejeztünk be. Ennek megfelelően a kezdeti ammónium-szulfát-koncentráció hozzávetőleg 1,3 M, míg a befejezési ammónium-szulfát-koncentráció 0 M volt. A gradiens változása az elúciós pufferben oszloptérfogatonként körülbelül 5%-os növekedés volt, vagy másképpen kifejezve, oszloptérfogatonként $-0,065$ M ammónium-szulfát volt. Az IgG körülbelül 7 oszloptérfogatnyi gradiensmennyiség után kezdett az oszlopról eluálódni, és az IgG elúciója hozzávetőleg 12 oszloptérfogatnyi gradiensmennyiség után fejeződött be (ennek során az ammónium-szulfát-koncentráció körülbelül 0,85 M-ról körülbelül 0,5 M-ra csökkent). Az eluált frakciókat az UV-elnyelés alapján addig gyűjtöttük össze, amíg a csúcs leszálló ágain az abszorbancia értéke a csúcsmagasság 20%-át el nem érte. Ezt követően a további eluátumokat egy másik edénybe gyűjtöttük (zárófrakció). A Phenyl oszloptöltet nem kötött frakcióját a fentiekben ismertetetteknek megfelelően vizsgáltuk az IgG-tartalomra, a teljes proteintartalomra és a Protein A-tarta-

lomra nézve. Az eluátum mennyisége körülbelül 15,4 liter volt, amely milliliterenként hozzávetőleg 2,2 milligramm proteint tartalmazott.

A Phenyl-eluátumot 30 000 MWCO (cut-off) Omega membránokkal (Filtron Corp.) ellátott, tangenciális áramlású ultraszűrőberendezés (Millipore CUF, Millipore Corp.) alkalmazásával körülbelül 16 milligramm/milliliter koncentrációra töményítettük, majd a puffert egy alkalmas készítménypufferrel szemben végzett folyamatos diafiltrálással lecseréltük.

A 6. táblázatban foglaltuk össze ennek a példának az oszlopparamétereit. Az egyes lépések termék- és proteinkinyerési adatait a 7. táblázatban tüntetjük fel; ugyanitt adjuk meg a Protein A-tartalom értékeit is, amelyeket (nanogramm Protein A)/(milligramm IgG) (ng/mg) egységben fejezünk ki, valamint az aggregálódott IgG mennyiségét, amelyet a teljes IgG-mennyiség %-ában fejezünk ki. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiai lépésben alkalmazott Phenyl-650M hatására a Protein A-tartalom körülbelül a harmadrészére csökkent, miközben a kihozatal értéke hozzávetőleg 90%. Míg a CM SEPHAROSE-eluátumban az IgG-aggregátumok mennyisége 0,5% volt, ez az érték a feldolgozott termékben 0,06%-ra csökkent.

6. táblázat

Oszlopparaméterek 40 grammos mennyiség alkalmazása esetén

Lépés	Oszloptérfogat (liter)	Oszlop átmérő × hossz (cm)	Feltöltési arány	Áramlási sebesség	
				(cm/óra)	(l/perc)
CM SEPHAROSE FF	4,2	25 × 8,5	8,9 g/liter ágytérfogat	150	1,2
Phenyl-650M	4,6	18 × 18	10,4 g/liter ágytérfogat	140	0,6

7. táblázat

Az IC. példa szerinti tisztítás összefoglalása
(40 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl-650M alkalmazása)

Lépés	Térfogat (liter)	Összes RSHZ-19 ^a (gramm)	Összes protein ^b (gramm)	A lépés hozama (%)	Protein A ^c (ng/mg)	IgG aggregátum (%)
Sejtmentes tenyésztőfolyadék	100	80,3	nincs adat	–	0	nincs adat
ProSep A-eluátum	15,8	73,8	80,4	92	20,2	nincs adat
CM SEPHAROSE ^d -feltöltés	(7,84) ^d	(36,0) ^d	(37,3) ^d			
CD SEPHAROSE-eluátum	5,71	36,5	37,3	100	21,4	0,5
Phenyl-650M-eluátum (termék)	15,4	32,8	33,6	90	8,0	<0,05
Phenyl zárófrakció	24,6	2,5	3,0	–	78,0	5,1 ^e
Késztermék	2,0	32,8	32,0	100	6,5	0,06
Összesített kihozatal (%)				83		
Tömegmérés (a feltöltés %-ában)				97		

^a HPLC-vel

^b abszorbancia 280 nm-nél; $1,27 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

^c ELISA alkalmazásával

^d Az előző oszlopról nyert eluátumnak csak egy részét vittük tovább (lásd a leírást).

^e A Protein A- és az aggregálódott IgG-elsődleges a zárófrakcióba áramlik.

ID. példa: Az RSHZ-19 tisztítása 125 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl-650M alkalmazásával

Egy 5,5 literes (20 cm átmérőjű és 18 cm hosszúságú) ProSep A affinitáskromatográfiás oszlopot 4,8 liter/perc áramlási sebesség mellett PBS-sel (lásd: 1. táblázat) ekvilibráltunk. Egy literenként 0,94 g RSHZ-19 monoklonális antitestet tartalmazó kondicionált sejtenyésző médium 450 liternyi mennyiségét a fentiekben ismertetteknek megfelelően mikroszűrővel szűrtük, majd négy 90–95 literes és egy 40 literes részlet formájában 4,8 liter/perc áramlási sebesség mellett feltöltöttük az oszlopra (mind az öt részlet felvitelének során 4,8 liter/perc értékű áramlási sebességet alkalmaztunk). Minden egyes oszlopciklus esetén a következők szerint jártunk el: a feltöltés befejezése után 4,8 liter/perc áramlási sebesség mellett körülbelül 17 liter PBS/glicint vittünk fel az oszlopra. Az IgG-t 15–20 liter ProSep A elúciós puffer alkalmazásával eluáltuk. A nem kötött csúcsokat és az elúciós csúcsot tartalmazó frakciókat HPLC alkalmazásával megvizsgáltuk az IgG-tartalomra nézve. Az eluátum mennyisége valamennyi ciklusban körülbelül 9 liter volt, amely literenként hozzávetőleg 5–10 milligramm proteint tartalmazott.

Az elúció után a minta pH-ját 2,5 M sósavoldat hozzáadásával azonnal 3,5-re állítottuk be, az oldatot körülbelül 30 percen keresztül állni hagytuk, majd hozzávetőleg 250 ml 1 M Tris-bázis hozzáadásával a pH-értékét 5,5-re állítottuk be. A pH 5,5-re történő beállításával végzett semlegesítés után a mintát előbb egy 0,1 µm-es Polygard CR szűrőn, majd egy steril 0,2 µm-es Millipak 200 szűrőn keresztül öt literes részletekben steril tartályokba szűrtük. A szűrletet 4 °C hőmérsékleten tároltuk. Megvizsgáltuk a szűrlet mintáit HPLC alkalmazásával az IgG-tartalomra nézve, valamint a 280 nm hullámhosszon mért abszorbancia alapján a teljes proteintartalomra nézve. ELISA-eljárással a minták Protein A-tartalmát, valamint HPLC alkalmazásával az IgG-aggregátumokat is analizáltuk.

Az ezt követő lépéseket alkalmazhatóvá tettük 40 gramm proteint befogadására. A 3,5-ös pH-értéken kezelt és szűrt ProSep A-eluátum körülbelül 130 g proteint tartalmazó 1,63 liternyi mennyiségét 2,4 liter/perc áramlási sebességgel közvetlenül felvittük egy 14,4 literes (35 cm átmérőjű és 15 cm hosszúságú), előzetesen CM ekvilibrációs pufferrel ekvilibrált CM SEPHAROSE FF oszlopra. A feltöltés befejezése után 2,4 liter/perc áramlási sebesség mellett hozzávetőleg 45 liter CM ekvilibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t 2,4 liter/perc áramlási sebességű CM elúciós puffer alkalmazásával eluáltuk. Az IgG körülbelül 1–2 ágytérfogatnyi elúciós puffer átfolyása után jött le az oszlopról. CM SEPHAROSE-eluátumként a teljes csúcsot összegyűjtöttük. A nem kötött csúcsok frakcióit és az eluátumot összegyűjtöttük, majd megvizsgáltuk az IgG-tartalmat, a teljes proteintartalmat és az aggregálódott IgG mennyiségét. Az eluátum mennyisége körülbelül 21 liter volt, amely hozzávetőleg 120 gramm proteint tartalmazott.

A CM SEPHAROSE-eluátum 19,4 liternyi mennyiségéhez egyenletes keverés közben lassan hozzáadtunk

összesen 9,7 liter guanidin törzsoldatot. Így a vírusok inaktiválásához a 29,1 liternyi oldat guanidinkoncentrációját 2 M-ra állítottuk be. A guanidinnal kezelt oldathoz keverés közben hozzáadtunk összesen 29,1 liter 2,6 M ammónium-szulfát-törzsoldatot. Az így nyert oldat végtérfogata 58,2 liter, guanidinkoncentrációja 1 M, valamint ammónium-szulfát-koncentrációja 1,3 M volt. Az ammónium-szulfáttal kezelt oldatot felvittük egy 12,4 literes (30 cm átmérőjű és 18 cm hosszúságú), előzetesen Phenyl ekvilibrációs pufferrel ekvilibrált TOYOPEARL Phenyl-650M oszlopra. A kísérlet során az áramlási sebesség értéke mindvégig 1,1–1,3 liter/perc volt. A feltöltés befejezése után az oszlopot körülbelül 37 liter Phenyl ekvilibrációs pufferrel mostuk. Az IgG-t lineáris gradiens alkalmazásával eluáltuk, amelyet 80% ekvilibrációs/20% gradienspufferrel kezdtünk, majd 12 oszloptérfogatnyi mennyiség után 20% ekvilibrációs/80% gradienspufferrel fejeztünk be. Ennek megfelelően a kezdeti ammónium-szulfát-koncentráció hozzávetőleg 1,0 M, míg a befejezési ammónium-szulfát-koncentráció 0,26 M volt. A gradiens változása az elúciós pufferben oszloptérfogatonként körülbelül 5%-os növekedés volt, vagy másképpen kifejezve, oszloptérfogatonként –0,065 M ammónium-szulfát volt. Az IgG lényegében a gradiens közepén jött le az oszlopról, és a csúcs ammónium-szulfát-koncentrációja hozzávetőleg 0,8 M volt. Az eluált frakciókat az UV-elnyelés alapján addig gyűjtöttük össze, amíg a csúcs leszálló ágán az abszorbancia értéke a csúcsmagasság 20%-át el nem érte. Ezt követően a további eluátumokat egy másik edénybe gyűjtöttük (zárófrakció). A Phenyl oszloptöltet nem kötött frakcióit, eluátumát, zárófrakcióját és a lemosópuffer frakcióját megvizsgáltuk az IgG-tartalomra, a teljes proteintartalomra és az aggregálódott IgG mennyiségére nézve. Az eluátum mennyisége körülbelül 29 liter volt, amely hozzávetőleg 100 gramm proteint tartalmazott.

A Phenyl-eluátumot 30 000 MWCO (cut-off) Omega membránokkal (Filtron Corp.) ellátott, tangenciális áramlású ultraszűrő berendezés (Millipore CUF, Millipore Corp.) alkalmazásával körülbelül 16 milligramm/milliliter koncentrációra töményítettük, majd a puffert egy alkalmas készítménypufferrel szemben végzett folyamatos diafiltrálással lecseréltük. A terméket megvizsgáltuk az IgG-tartalomra, a teljes proteintartalomra, a Protein A mennyiségére, valamint az aggregálódott IgG mennyiségére nézve.

A 8. táblázatban foglaltuk össze ennek a példának az oszlopparamétereit. Az egyes lépések termék- és proteinkinyerési adatait a 9. táblázatban tüntetjük fel; ugyanitt adjuk meg a Protein A-tartalom értékeit is, amelyeket (nanogramm Protein A)/(milligramm IgG) (ng/mg) egységben fejezünk ki, valamint az aggregálódott IgG mennyiségét, amelyet a teljes IgG-mennyiség %-ában fejezünk ki. A hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás lépésben alkalmazott Phenyl-650M hatására a Protein A-tartalom körülbelül a hetedrészére csökkent, miközben a kihozatal értéke hozzávetőleg 70%. Míg a CM SEPHAROSE-eluátumban az IgG-aggregátumok mennyisége 0,4% volt, ez az érték a feldolgozott termékben 0,06%-ra csökkent.

8. táblázat
Oszlopparaméterek 125 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl–650M alkalmazása esetén

Lépés	Oszloptérfogat (liter)	Oszlop átmérő × hossz (cm)	Feltöltési arány	Áramlási sebesség	
				(cm/óra)	(l/perc)
ProSep A	5,0	20 × 18	14–16 g RSHZ–19/liter ágytérfogat	915	4,8
CM SEPHAROSE FF	14,4	35 × 15	8,4 g protein/liter ágytérfogat	150	2,4
Phenyl–650M	12,4	30 × 18	8,6 g protein/liter ágytérfogat	100	1,2

9. táblázat
Az ID. példa szerinti tisztítás összefoglalása
(125 grammos mennyiség és TOYOPEARL Phenyl–650M alkalmazása)

Lépés	Térfogat (liter)	Összes RSHZ–19 ^a (gramm)	Összes protein ^b (gramm)	A lépés hozama (%)	Protein A ^c (ng/mg)	IgG-aggregátum (%)
Sejtmentes tenyésztőfolyadék	416	392	477 ^c	–	0	nincs adat
ProSep A-eluátum	48,7	375	384	96	11,7	0,4
CM SEPHAROSE ^d -feltöltés	(16,3) ^d	(125) ^d	(129) ^d	–		
CD SEPHAROSE-eluátum	20,6	116	117	93	nincs adat	0,4
Phenyl–650M-eluátum	29,1	98,1	99,8	85	nincs adat	<0,05
Késztermék	9,29	89,8	91,1	92	1,7	0,06
Összesített kihozatal (%)				70		

^a fordított fázisú HPLC-vel

^b abszorbancia 280 nm-nél; 1,27 ml · mg⁻¹ · cm⁻¹

^c Bradford-vizsgálattal

^d A következő eljárási lépés kapacitás körülbelül 140 gramm; a teljes ProSep A-eluátumnak csak egy részét vittük tovább.

10. táblázat
Tisztasági vizsgálat (125 grammos mennyiség alkalmazása)

Lépés	Aggregátumok (a teljes IgG %-a)	Tisztaság ^a (a teljes terület %-a)	Aktivitás ^b (%)
CCF	nem alkalmazható	nem vizsgáltuk	80 ^c
ProSep A-eluátum	0,4	98,5	105
CM-eluátum	0,4	98,4	109
Phenyl-eluátum	<0,05	98,3	99
Végtermék	0,06	99,7	115

^a Redukáló SDS–PAGE pásztázó denzitometriás úton meghatározva; az IgG nehéz és könnyű láncaihoz tartozó területek összege.

^b A bovin RS víruskötő ELISA alkalmazásával meghatározott aktivitásnak az A280-nal meghatározott RSHZ–19 koncentrációra vonatkoztatott számított aránya

^c A bovin RS víruskötő ELISA alkalmazásával meghatározott aktivitásnak a HPLC-vel meghatározott RSHZ–19 koncentrációra vonatkoztatott számított aránya.

II. példa

Az anti-CD4 monoklonális antitest CH–CD14-et sejtenyésztési eljárással állítottuk elő, majd az I. példában alkalmazott módszerhez hasonlóan Protein A- és ion-

cserés kromatográfiával részlegesen tisztítottuk, azonban ebben az esetben egy anioncserélő gyantát használtunk. Egy 1 cm átmérőjű és 10 cm magasságú Amicon oszlopot megtöltöttünk 8 ml TOYOPEARL Phenyl–650M

gyantával (tételszám: 65PHM01 H). Az áramlási sebességet valamennyi lépésben 2 ml/perc értéken tartottuk. Az oszlopot 20 ml ekvibrációs pufferrel (1 M ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7,0) ekvibráltuk. Az oszlopra feltöltendő terméket úgy állítottuk elő, hogy 5 ml részlegesen tisztított CH-CD14 monoklonális antitesthez (amelynek koncentrációja a 280 nm hullámhosszon mért abszorbancia alapján 17 mg/ml) hozzáadtunk 2,5 ml 6 M guanidin-hidroklorid és 50 mM nátrium-foszfát keveréket (pH 7,0), az oldatot összekevertük, 30 percen keresztül állni hagytuk, majd hozzáadtunk 7,5 ml 2 M ammónium-szulfát és 50 mM nátrium-foszfát keveréket (pH 7,0). Az oszlopra feltöltött anyag a következő jellemzőkkel rendelkezett: végső ammónium-szulfát-koncentráció=1 M; végső guanidin-hidroklorid-koncentráció=1 M; a mintavétel utáni végső

térfogat=12 ml; és a termék végső koncentrációja=5,6 mg/ml. Ezt követően az anyagot 2 ml/perc áramlási sebesség mellett feltöltöttük az oszlopra, majd 10 oszloptérfogatnyi ekvibrációs puffer→50 mM nátrium-foszfát (pH 7,0) lineáris gradienssel eluáltuk. A terméknek az oszlopról történő elúciója alatt körülbelül 4 ml-es frakciókat szedtünk.

Az eredményeket a 11. táblázatban mutatjuk be. Az összes termék a gradiensben eluálódott. Annak érdekében, hogy a végtermékben csökkentsük a Protein A mennyiségét, szükségessé vált néhány, a gradiens végén szedett frakció mellőzése, ami némileg csökkentette a termék kihozatalát. A Protein A mennyiségének felére csökkentésével 86%-os termékkihozatalt tudtunk elérni, míg ha a Protein A mennyiségét harmadrészre csökkentettük, az elérhető termékkihozatal 50%-os volt.

11. táblázat

Frakciószám	Térfogat (ml)	Termék (mg/ml)	Protein A (ng/ml)	Halmazott spec. Protein A (ng/mg)	Halmazott termékhozam (%)	Protein A-eltávolítási tényező ^a
	Felvitt					
0.	12	5,8	200,7	35		
	Eluátum					
1.	5,5	0,04	0,0	0	0	
2.	3	0,31	0,0	0	2	
3.	4,2	1,32	6,4	4	10	8,6
4.	4,2	3,1	46,9	5	28	7,0
5.	4	4	68,3	10	51	3,3
6.	4,2	3,4	80,9	14	72	2,4
7.	4,2	2,3	94,1	19	86	1,9
8.	4,2	1,3	79,3	22	94	1,6
9.	4,2	0,71	49,9	24	98	1,4
10.	4,2	0,36	32,8	26	100	1,3
11.	4	0,19	22,9	27	101	1,3
12.	4	0,11	13,5	27	102	1,3
13.	9,6	0,05	8,5	28	102	1,2

^a Az eltávolítási tényező értékét úgy számítottuk ki, hogy az eluátum kezdetétől a kívánt frakciókig összeöntöttük az eluátumfrakciókat, majd a feltöltött anyagban lévő kezdeti Protein A-koncentrációt (ng/mg) elosztottuk az összeöntött eluátumfrakciókban lévő Protein A-koncentrációval (ng/mg). Például a 8,6 értékű tényezőt úgy számítottuk ki, hogy az 1–3. frakcióban lévő Protein A összegével elosztottuk az 1–3. frakcióban lévő termék összegét, és így 4 ng/mg-ot kaptunk. Ezzel a számmal ezt követően elosztottuk a feltöltött anyagban lévő 35 ng/mg értékét, és így az eltávolítási tényező 8,6-os értékét nyertük.

IIB. példa

CH-CD4 monoklonális antitestet a IIA. példában ismertetetteknek megfelelően részlegesen tisztítottuk és előkészítettünk a hidrofób kölcsönhatási kromatográfias oszlopra történő feltöltéshez. Ugyanazt az oszlopot, áramlási sebességet, ekvibrációt és feltöltést alkalmaztuk, mint a IIA. példában. Ebben a példában az oszlop feltöltése és ekvibrációs pufferrel végzett mosása után az oszlopot 18 ml mosópufferrel (1 M ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-citrát, pH 3,5) mostuk. Ezt követően 13,5 ml ekvibrációs pufferrel (összetételét lásd

50 a IIA. példában) egy további mosást végeztünk. Az oszlopot a IIA. példában ismertetetteknek megfelelően gradienssel eluáltuk, majd vízzel mostuk. Az oszlopról nyert eluátumot 14 ml-es frakciókra osztottuk, amelyeket ezt követően a termékre és a Protein A-ra nézve analízáltuk.

55 Az eredményeket a 12. táblázatban mutatjuk be. A Protein A mennyiségét hatodrészt csökkentve 90%-os termékkihozatalt tudtunk elérni, míg ha a Protein A mennyiségét nyolcadrészt csökkentettük, az elérhető termékkihozatal 78%-os volt.

12. táblázat

Frakciósám	Térfogat (ml)	Termék (mg/ml)	Protein A (ng/ml)	Halmazott spec. Protein A (ng/mg)	Halmazott termékhozam (%)	Protein A eltávolítási tényező ¹
	Felvitt					
0.	12	5,80	167,1	29		
	Eluátum					
1.	14	1,50	0	0,0	30	–
2.	14	2,35	13,6	3,5	78	8,1
3.	14	0,38	8,3	5,2	85	5,6
4.	14	0,18	0	5,0	89	5,8
5.	9	0,13	0	4,9	91	5,9

¹ Lásd a 11. táblázat lábjegyzetében „a” jelentését

A IIB. példa eredményeit összehasonlítva a IIA. példa eredményeivel látható, hogy amennyiben az eljárás magában foglalta a pH 3,5 értékű mosást is, a Protein A mennyisége körülbelül 80%-os kihozatal mellett a hat-nyolcad részére csökkent, ugyanakkor a pH 3,5 értékű mosás nélkül, a CH-CDH 80%-os kihozatala mellett a Protein A mennyisége csak körülbelül felére csökkent.

IIC. példa

Ezt a példát a IIB. példához hasonló módon végeztük, azonban ebben az esetben jelentősen megnöveltük a mennyiségeket, illetve a méreteket. Az oszlop 5 cm átmérőjű és 28 cm magasságú volt, míg az áramlási sebesség értéke 50 ml/perc volt. CH-CD4 monoklonális antitestet állítottunk elő és részlegesen tisztítottunk a IIA. példában ismertetetteknek megfelelően. A részlegesen tisztított terméket (440 ml) 31 percen keresztül 220 ml 6 M guanidin-hidrokloriddal kevertük. Ezt követően

660 ml 2 M ammónium-szulfát és 50 mM nátrium-foszfát keveréket (pH 7,0) adtunk hozzá. A végső ammónium-szulfát-koncentráció 1 M, míg a végső antitest-koncentráció 5,3 mg/ml volt. Mintavétel után a feltöltési térfogat 1290 ml volt.

Az oszlopot két oszloptérfogatnyi ekvibrációs pufferrel ekvibráltuk, majd feltöltöttük az oszlopot. Az oszlopot ezt követően 630 ml ekvibrációs pufferrel, 1000 ml mosópufferrel és 800 ml ekvibrációs pufferrel mostuk, majd 5 oszloptérfogatnyi gradienssel [(0,75 M ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, pH 7,0)→(50 mM nátrium-foszfát, pH 7,0)] eluáltuk. Az elúció ideje alatti frakciókat összegyűjtöttük.

Az eredményeket a 13. táblázatban foglaljuk össze. Az antitest 70%-os kihozatala mellett a Protein A mennyisége századrészére csökkent, illetve az antitest 80%-os kihozatala mellett a Protein A mennyisége harmincadrésze csökkent.

13. táblázat

Frakciósám	Térfogat (ml)	Termék (mg/ml)	Protein A (ng/ml)	Halmazott spec. Protein A (ng/mg)	Halmazott termékhozam (%)	Protein A eltávolítási tényező
	Felvitt					
0.	1290	5,30	198	37		
	Eluátum					
1.	581	0,03	0	0,0	0	
2.	304	3,60	0	0,0	16	
3.	243	5,40	0	0,0	35	
4.	238	4,50	0	0,0	51	
5.	237	3,40	2,4	0,1	63	282
6.	239	2,2	4,7	0,4	71	107
7.	256	1,2	4,8	0,6	75	66
8.	252	0,7	7,6	0,9	78	41
9.	240	0,4	5,3	1,1	79	33
10.	250	0,4	5,7	1,4	81	27
11.	202	0,4	4,38	1,5	82	25
12.	210	1	148,5	6,8	85	5

IIC. példa

A IIA. példában ismertetett módon részlegesen tisztított CH-CD4 monoklonális antitestet állítottunk elő. A részlegesen tisztított monoklonális antitest 9,5 mg/ml koncentrációjú oldatának 8 ml-éhez hozzáadtunk 4 ml 6 M guanidin-hidroklorid és 50 mM nátrium-foszfát keveréket (pH 7,0). Az így nyert keveréket 30 percen keresztül inkubáltuk. Ezt követően lassan 12 ml 2 M ammónium-szulfát és 50 mM nátrium-foszfát keveréket (pH 7,0) adtunk hozzá. Az oszlop 0,5 cm átmérőjű és 20 cm magasságú (4 ml térfogatú) volt, az áramlási sebesség értéke minden lépésben 0,5 ml/perc volt. Az oszlopot két oszloptérfogatnyi vízzel és két oszloptérfogatnyi ekvibrációs pufferrel mostuk át. Ezt követően 22 ml feltöltési oldatot engedtünk át az oszlopon, majd mosópuffert vittünk fel az oszlopra addig, amíg az oszlopeffluens pH-ja 3,5-ös értéket ért el. Ezt követően ekvibrációs puffert engedtünk keresztül az oszlopon addig, amíg az effluens pH-ja 7,0 lett. Az oszlopot 0,3 M ammónium-szulfát és 50 mM nátrium-foszfát keverékkel (pH 7,0) eluáltuk. Miután az UV-görbe emelkedni kezdett, 12,6 ml eluátumot szedtünk, majd a termékre és a Protein A-re nézve analizáltuk. A termék hozatala 80% volt, és a Protein A mennyisége 28 ng/mg-ról 6 ng/mg-ra csökkent, ami 4,7-szeres csökkenésnek felelt meg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás monomer immunglobulin G antitestnek egy monomer immunglobulin G antitestet és legalább egy immunglobulinaggregátumot, hibás formát, gazdasajtproteint vagy Protein A-t tartalmazó keverékből történő tisztítására, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltettel érintkeztetjük, és a monomert szelektíven eluáljuk a töltetről.

2. Eljárás monomer immunglobulin G antitestnek egy monomer immunglobulin G antitestet tartalmazó, kondicionált sejtenyésztesztő médiumból történő tisztítására, *azzal jellemezve*, hogy a médiumot egymást követően a) Protein A-kromatográfiának, b) ioncserés kromatográfiának és c) hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának vetjük alá.

3. Eljárás antitestnek kondicionált médiumból történő tisztítására, *azzal jellemezve*, hogy

- az antitestet egy Protein A kromatográfiás tölteten adszorbeáljuk;
- az adszorbeált antitestet legalább egy pufferrel mosuk;
- a b) lépésben kapott antitestet eluáljuk;
- a c) lépésben kapott antitestet egy ioncserés kromatográfiás tölteten adszorbeáltatjuk;
- az adszorbeált antitestet legalább egy pufferrel mosuk;
- az e) lépésben kapott antitestet szelektíven eluáljuk;
- az f) lépésben kapott eluátumot egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás tölteten adszorbeáltatjuk;
- az adszorbeált antitestet legalább egy pufferrel mosuk;

- az adszorbeált antitestet eluáljuk; és
- kinyerjük az antitestet.

4. Eljárás Protein A-nak egy Protein A-t és antitesteket tartalmazó keverékből történő eltávolítására, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket egy hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltettel érintkeztetjük, majd a töltetről szelektíven eluáljuk az antitestet.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eljárás az esetleg jelen lévő vírusok inaktiválására egy vagy több további, adott esetben végrehajtható lépést tartalmaz.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az f) lépés után és a g) lépés előtt hajtunk végre egy vírusinaktiválási lépést.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vírusinaktiválási lépés során az eluátumot a vírusok inaktiválásához elegendő időtartamban guanidin-hidrokloriddal kezeljük, majd a keverékhez egy ammónium-szulfát-oldatot adunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a jelen lévő guanidin-hidroklorid koncentrációja 2,0 M, majd az f) lépésben kapott eluátum kezelése során az ammónium-szulfát-koncentrációt 1,3 M-ra állítjuk be.

9. A 6–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a c) lépés után és a d) lépés előtt egy további vírusinaktiválási lépést hajtunk végre.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a további vírusinaktiválási lépés során a c) lépés eluátumát savval kezeljük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eluátum pH-jának értékét 3,5-re állítjuk be, az eluátumot a vírusok inaktiválásához elegendő időtartamban ezen a pH-értéken tartjuk, majd a kezelést 5,5-es pH-értékre történő beállítással fejezzük be.

12. A 3. vagy 5–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a proteint úgy nyerjük ki, hogy az i) kromatográfiás lépésben kapott, a proteint tartalmazó frakciókat összeöntjük és ultrafiltrálásal betöményítjük.

13. A 2., 3. vagy 5–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a d) lépés szerinti ioncserés töltetet a következő csoportból választjuk ki: karboxi-metil-csoporttal (CM), szulfo-etil-csoporttal (SE), szulfo-propil-csoporttal (SP), foszfát-csoporttal (P), (diethyl-amino)-etil-csoporttal (DEAE), kvaterner amino-etil-csoporttal (QAE) és kvaterner aminocsoporttal (Q) szubsztituált cellulózozos gyanták, térhálósított dextránok, agaróz és szerves polimer gyanták.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ioncserés kromatográfia során egy, a következő csoportból kiválasztott, pufferelt sóoldattal kezelt töltetet alkalmazunk: CM-23, CM-32, CM-52 cellulóz; CM és SP térhálósított dextránok; CM és S agaróz; CM szerves polimer gyanta; DEAE-QAE-Q térhálósított dextránok; DEAE-, QAE-, Q-kötött agaróz; és DEAE szerves polimer gyanta.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a töltet CM agaróz Fast Flow, és a só nátrium-klorid.

16. A 14. vagy 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pufferealt sóoldat 40 mM citrátot tartalmazó, 6,0-os pH-értékű 100 mM nátrium-klorid-oldat.

17. A 2., 3. vagy 5–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Protein A-kromatográfia során töltésként szabályozott pórusméretű üveghez kötött Protein A-t alkalmazunk, és az elúciót egy alacsony pH-értékű pufferrel végezzük.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a puffer 3,5 pH-értékű 25 mM citrát.

19. A 3., 5–13. vagy 17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a h) lépés szerinti adszorbeált antitestet két pufferrel, először egy ekvibrációs pufferrel, majd másodszer egy alacsony pH-értékű mosópufferrel mossuk.

20. A 4. vagy 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eluálás előtt a töltetet egy 7,0-nél kisebb pH-értékű pufferrel mossuk.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mosópuffer pH-értéke kisebb, mint 4,0.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a puffer 3,5 pH-értékű 1 M ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-citrát.

23. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hidrofób kölcsönhatási kromatográfiás töltetet a következő csoportból választjuk ki: (2–8 szénatomos alkil)-agaróz, aril-agaróz, alkil-kovásav, aril-kovásav, alkil-(szerves polimer)-gyanta és aril-(szerves polimer)-gyanta.

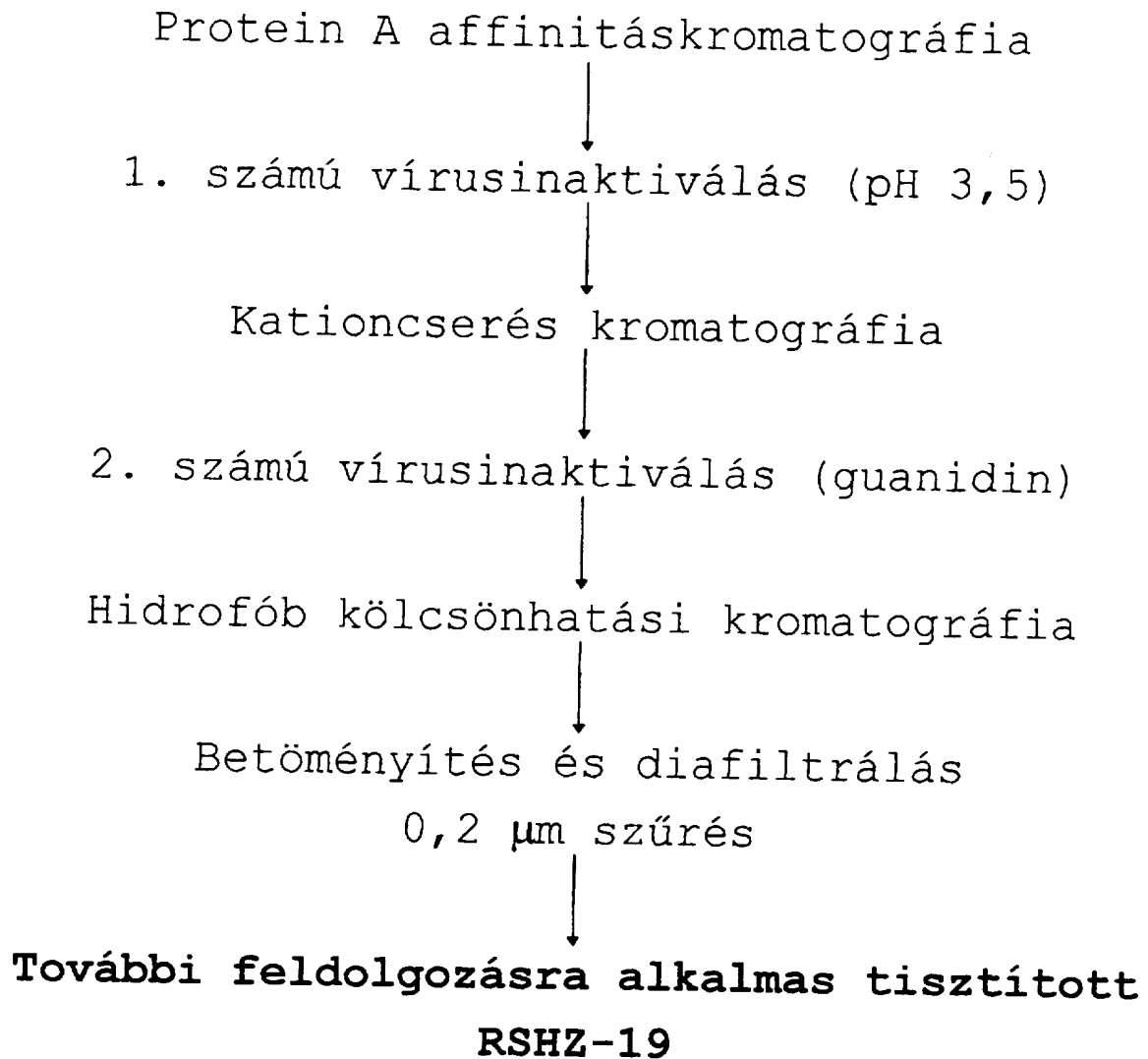
24. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a töltetet a következő csoportból választjuk ki: butil-, fenil- és oktil-agaróz, valamint butil-, fenil- és éter-(szerves polimer)-gyanta.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a töltet fenil-(szerves polimer)-gyanta vagy butil-(szerves polimer)-gyanta.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az antitestet egy olyan gradienssel eluáljuk selektíven, amely 50 mM nátrium-foszfát-pufferre (pH 7,0) csökken.

27. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az immunglobulin G-t az anti-RSHZ–19 és a CH–CD4 által alkotott csoportból választjuk ki.

Kondicionált médium



1. ábra