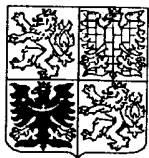


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 035

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 347

(22) Přihlášeno: 05.02.1997

(30) Právo přednosti:
08.02.1996 DE 1996/19604583

(40) Zveřejněno: 17.09.1997
(Věstník č. 9/1997)

(47) Uděleno: 15.06.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 16.08.2000
(Věstník č. 8/2000)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/23
C 12 P 21/02
C 07 K 14/57

(73) Majitel patentu:

FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E. V., München, DE;

(72) Původce vynálezu:

Otto Bernd Dr., Hannover, DE;
Waschütza Gero, Meinersen, DE;
Zakaria Hayssam, Zaatzen, DE;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha
4, 14021;

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy rozpustných rekombinantních
proteinů z bakteriálních buněk**

(57) Anotace:

Rozpustné rekombinantní proteiny se připravují z bakterií, jejichž plazmid obsahuje kompletní gen za promotorem, tím způsobem, že se tento plazmid exprimuje a získaný protein izoluje a čistí, a to tak, že se buněčná kultura kultivuje až k OD 600 nm od 0,4 až 0,6, buněčná kultura se ochlazuje během časové periody od 15 do 40 minut na 20 až 26 °C, syntéza se indukuje přidáním 10 až 55 μm induktoru a indukční fáze se provádí při teplotě od 20 do 26 °C po dobu časové periody od 3,5 do 6,5 hodiny.

CZ 287035 B6

Způsob přípravy rozpustných rekombinantních proteinů z bakteriálních buněk

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu přípravy rozpustných rekombinantních proteinů z bakteriálních buněk.

Dosavadní stav techniky

10

Rozpustné rekombinantní proteiny jsou zpravidla připravovány z bakterií tím způsobem, že se exprimuje expresní plazmid, protein se izoluje a přečistí. Způsoby tohoto typu jsou známé z přípravy nejrůznějších proteinů. Například pro expresi γ -interferonu v *E. coli* byl sestaven plazmid PKK 233-2 (E. Ammann a J. Brosius: *Gene* 40, 1893-1900, 1985). Tento plazmid obsahuje indukovatelný *trc*-promotor, vícenásobné klonovací místo, které obsahuje startovní kodon ATG, jakož i terminátory pro RNA-polymerázu.

15

Identický způsob je znám ze spisu DE 36 856.4. V tomto dokumentu je mimo jiné popsán rovněž způsob výroby zkrácené varianty γ -interferonu (γ -interferon 10L), vycházející opět z odpovídajícího expresního plazmidu. Také tento plazmid je exprimován v bakteriálních buňkách (*E. coli*) v množství 30 % z celkového množství proteinu. Až 90 % tohoto γ -interferonu se přitom vyskytuje ve formě nerozpustných, tzv. inkluzních částic. Pro čištění tohoto γ -interferonu se přitom bakteriální buňky po úspěšné expresi rozbijí a inkluzní částice γ -interferonu se opakovaným promytím zbaví rozpustných bakteriálních proteinů. Rozbití buněk se výhodně provádí mechanicky, obzvláště působením ultrazvuku. Inkluzní částice interferonu se poté převedou denaturačním krokem do roztoku, který se následně podrobí renaturačnímu kroku. Tento renaturační krok je nezbytný proto, že při přípravě proteinů z inkluzních částic se takto získané proteiny nevyskytují v biologicky aktivní formě. Renaturačním krokem se má dosáhnout opět uspořádání proteinu do biologicky aktivní formy.

20

25

30

Nevýhodou tohoto způsobu dosavadního stavu techniky ovšem je, že jednak výtěžek přípravy proteinů z inkluzních částic je velmi nízký (např. u vybraného popsaného způsobu asi 10 %) a navíc se ukázalo, že renaturační krok nezaručuje vždy, že se protein získá kompletně ve své biologicky aktivní formě. Ukázalo se, že u proteinů, které byly získány z inkluzních částic, se obvykle vyskytuje nehomogenní populace struktury proteinu.

35

Podstata vynálezu

40

Cílem předloženého vynálezu je vylepšení shora popsaného způsobu tak, aby bylo jednak dosaženo podstatného zvýšení výtěžku a současně aby bylo možno protein izolovat v jeho aktivní formě bez nutnosti použití renaturačního kroku.

45

Úkol vynálezu je splněn význakovými znaky nároku 1. Závislé nároky odhalují výhodná provedení.

50

Překvapivě se ukázalo, že při přesném dodržení parametrů způsobu podle nároku 1 při exprimování plazmidu je možné získat protein v roztoku. Po indukční fázi zůstává 20 - 60 % proteinu v rozpuštěné formě, pouze zbývající část je vysrážena ve formě inkluzních částic. Při způsobech dosavadního stavu techniky se vysráží obvykle více než 95 % proteinu ve formě inkluzních částic. Přednost tohoto způsobu spočívá v tom, že uspořádání proteinu, např. γ -interferonu, do prostorové struktury probíhá samo o sobě v bakteriální buňce. U těchto způsobů tedy nejsou nezbytné, jako je tomu u způsobů dosavadního stavu techniky, denaturační a renatu-

rační kroky, protože se prostorová struktura sama tvoří v bakteriální buňce. Z tohoto důvodu je vyloučena možnost neúplného přechodu do řádné prostorové struktury během renaturačního kroku. Zvláště významná je u těchto způsobů ta skutečnost, že se nejen tvoří protein v aktivní formě homogenním způsobem, nýbrž rovněž výtěžek u tohoto způsobu je výrazně vyšší. Např. pro γ -interferon dosahuje 50 % oproti cca 10 % u způsobů dosavadního stavu techniky.

Pro způsob podle vynálezu je důležité, aby byly dodrženy přesně a exaktně znaky způsobu, které jsou uvedeny v nároku 1. Pouze kombinací jednotlivých znaků způsobu a) až e) je zaručeno, že proteiny mohou být z proteinového roztoku získány. Podstatné u parametrů způsobu je, že buněčná kultura je kultivována při OD od 0,4 až 0,6 nm až do 600 nm a následně probíhá ochlazování v průběhu určitého definovaného časového úseku (15 až 40 minut) na určitou definovanou teplotu (20 až 26 °C). Toto ochlazování společně s velmi nízkou koncentrací induktoru (10 až 55 mM) zaručuje, že po indukční periodě, probíhající při teplotě 20 až 26 °C po dobu 3,5 až 6,5 hodiny, se nachází 20 až 60 % proteinu v rozpustné formě. Zbývající část se vysráží ve formě inkluzních částic.

Podrobné výzkumy ukázaly, že např. při teplotách kolem 37 °C během indukční periody dochází k vysrážení více než 95 % proteinu ve formě inkluzních částic. Očividně má zde tedy rozhodující význam u způsobu podle vynálezu snížení teploty ve spojení s nízkou koncentrací induktoru.

Izolace a čištění proteinu se provádí tím způsobem, že se nejprve provádí frakcionace. Pro tento účel se bakteriální buňky po fázi exprese známým způsobem rozbijí (např. ultrazvukem) a následně se přidá pufr. Výsledkem centrifugace je jednak pevný podíl, obsahující inkluzní částice, a proteinový roztok. Pro další zpracování se používá dále pouze uvedený proteinový roztok, který se podrobuje dalšímu čištění. To může být provedeno např. tak, že se proteinový roztok míchá s katexovým materiálem. Přitom dochází k navázání proteinu na katexový materiál. Katex s navázaným proteinem se promyje fosfátovým pufrem a protein je možno vylučovat roztokem chloridu sodného v pufru. Pro dokonalé přečištění je možno následně využít srážení sulfátem amonným a gelovou filtrací.

Výsledky mnoha pokusů prokázaly, že je výhodné, když se uvedený způsob provádí při dodržení následujících parametrů:

Fáze způsobu a): OD 600 nm od 0,45 do 0,55 při teplotě 35 až 38 °C, zvláště výhodně od 0,5 při 37 °C.

Fáze způsobu b): časový úsek 25 až 35 minut, zvláště výhodně 30 minut, ochlazování na 24 až 26 °C, zvláště výhodně na 25 °C.

Fáze způsobu c): přídavek od 10 do 50 μ m, zvláště výhodně 50 μ m induktoru.

Fáze způsobu d): indukční fáze od 3,5 do 5,5 hodiny při 24 až 26 °C, zvláště výhodně přes 5 hodin při 25 °C.

Ukázalo se, že způsob podle vynálezu je zvláště vhodný pro přípravu γ -interferonu a jeho derivátů a že tímto způsobem je možno získávat nejenom γ -interferon ve shora popsané aktivní a vysoce čisté formě, nýbrž rovněž jeho varianty, které jsou např. zkráceny o 10 aminokyselin, nebo také varianty, které vykazují přítomnost disulfidického můstku. V tomto případě jak v redukované, tak rovněž v oxidované formě. Z literatury dosud není známo, že by bylo možno získat γ -interferon z inkluzních částic v redukované formě. Způsob podle vynálezu se tak vyznačuje nejen tím, že mohou být proteiny získávány ve vysokém výtěžku v čisté formě, nýbrž rovněž tím, že tento způsob umožňuje prokazatelně také exprimování těchto proteinů, u kterých to dosavadní způsoby s inkluzními částicemi neumožňovaly.

Způsob podle vynálezu je v následující části podrobně popsán na přípravě γ -interferonu. Jak již byl shora uvedeno, není způsob ovšem omezen pouze na γ -interferon, nýbrž je použitelný zásadně pro všechny rozpustné proteiny, které se exprimují z bakteriálních buněk.

5

Příklady provedení vynálezu

Expresa (syntéza) γ -interferonu

10

Buňky *E. coli* (JM 105) s expresním plazmidem, obsahujícím kompletní gen pro γ -interferon za trc-promotorem, jsou kultivovány až k OD 600 nm od 0,5 při 37 °C. Bylo nasazeno 500 ml YT média, které bylo naočkováno shora uvedenou buněčnou kulturou.

15

Buněčná kultura se během 30 minutové periody ochladí na teplotu 25 °C. Syntéza γ -interferonu se indukuje přidávkem izopropyl- β -D-tiogalaktosidu (IPTG) do výsledné koncentrace 50 μ m. Indukční fáze probíhá při teplotě 25 °C po dobu 5 hodin. Po této indukční fázi se nachází 20 až 60 % γ -interferonu ve formě rozpustného proteinu, zbylá část γ -interferonu je precipitována ve formě inkluzních částic.

20

Frakcionace γ -interferonu

25

Po 5 hodinové fázi exprese se bakteriální buňky odstředí centrifugací (15 minut, 6000 rpm v rotoru JA 15). Výsledná peleta buněk se promyje 200 ml pufru PBS (fosfátem pufovaná solanka) nebo natriumfosfátovým pufrem pH 7,0 resuspendováním. Opakovanou centrifugací popsanou shora se získá promytá buněčná peleta, která se buď ihned podrobí dalšímu přečištění, nebo se dále uchovává při -70 °C.

30

K promyté buněčné peletě se přidá 15 ml pufru PBS nebo natriumfosfátového pufru a buňky se rozbijí ultrazvukem (5 x 10 sekund za chlazení ledem). Následně se přidá znovu 15 ml pufru a zředěná směs se centrifugací (30 minut, 10 000 rpm, 7A 20 rotor) frakcionuje na rozpustný podíl, obsahující protein (frakce I) a peletu, obsahující inkluzní částice.

35

Přečištění rozpustného γ -interferonu

SP-Sepahrosa:

40

Do frakce I se opatrně rozmíchá 1 ml SP-Sepharosy, ekvilibrované ve stejném pufru (kationtová kapacita 20 mg proteinu). Po 30 minutách na ledu se provádí centrifugace 10 minut při 3500 rpm. Peleta SP-Sepharosy, na níž je navázán γ -interferon, se zbaví dvěma po sobě jdoucími promývacími kroky (po 15 ml pufru) proteinů *E. coli*. Vázaný γ -interferon se 2 ml 1M NaCl kompletně eluuje do pufru a následně se oddělí centrifugací od SP-Sepharosového materiálu. Eluční kroky se dvakrát opakují, aby bylo zajištěno, že se ze SP-Sepharosy eluuje veškerý γ -interferon. Eluce proteinu je sledována měřením poměru OD 280/260 nm. Obě frakce s největší OD, obvykle oba první eluáty, se spojí do frakce II. Tento čistící krok je vzhledem k vysokému IEB (izoelektrický bod γ -interferonu je vyšší než 10) velmi účinný. Tímto způsobem se zvýší čistota γ -interferonu z původních přibližně 5 % na více než 90 %.

50

Srážení pomocí ammoniumsulfátu

Pomalým přidáváním 440 mg jemně rozetřeného ammoniumsulfátu (AS) k frakci II (4 ml) se dosáhne 70 % nasycení této frakce ammoniumsulfátem. Po přibližně 12 hodinách při 4 °C se

vysrážený γ -interferon oddělí centrifugací (30 minut při 10 000 rpm, rotor JA 20) ve formě AS-pelety. K peletě se přidá 1 ml pufru (frakce III).

Gelová filtrace

5

Frakce o objemu 1 ml se sterilně přefiltruje (velikost pórů 0,2 μm) a pomocí kolony TSKG 200 se frakcionuje za vzniku rozdílné velikosti vzorku (200 μm - 1 ml). Tento krok gelové filtrace poskytuje (obr. 1) symetrické rozdělení proteinu γ -interferonu a s pomocí standardních proteinů ukazuje, že se γ -interferon vyskytuje ve formě homodimerního proteinu.

10

Charakterizace rozpustného γ -interferonu

Výsledky analýzy SDS-gelové elektroforézy (SDS-gel) potvrzují stupeň čistoty vyšší než 95 %. Ačkoli při přímém srovnání s odpovídajícím γ -interferonem z inkluzních částic je pozorována o něco rychlejší migrace získaného proteinu, což poukazuje na minimální zkrácení o několik aminokyselin, lze tímto způsobem získat rozpustný γ -interferon ve formě celkově neporušeného proteinu. Specifická antivirální aktivita rozpustného γ -interferonu 2×10^{-7} n/mg proteinu odpovídá aktivitě γ -interferonu, získaného z inkluzních částic.

15

Přednosti rozpustného γ -interferonu

Přednost tohoto způsobu spočívá v tom, že uspořádání proteinu γ -interferonu do prostorové struktury probíhá v bakteriálních buňkách. Neexistuje žádný poukaz na existenci nehomogenní strukturní populace tohoto proteinu. S použitím stejné násady je možno syntetizovat a získat ve vysoké čistotě rovněž variantu γ -interferonu, která je zkrácena o 10 aminokyselin, a varianta, do níž jsou vloženy dva cysteiny takovým způsobem, že se může vytvořit interní disulfidický můstek.

25

Výtěžek přečištěného produktu dosahuje až 50 % u všech zkoumaných proteinů γ -interferonu a vyniká tím ve srovnání s 10% výtěžkem u γ -interferonu, získaného z inkluzních částic, který je nutno in vitro v reagenční baňce převést na správnou prostorovou strukturu. Ze 4 g pelety buněk je možno získat zhruba 4 mg vysoce čistého rozpustného γ -interferonu.

30

Rozpustný γ -interferon, obsahující disulfidický můstek, je možno přečistit a uchovávat jak v redukované, tak v oxidované formě proteinu. Odpovídající γ -interferon z inkluzních částic je možno získat pouze v oxidované formě.

35

Z toho je možno vyvodit, že γ -interferon, převedený na prostorovou strukturu in vitro, je strukturně nehomogenní, zatímco rozpustný γ -interferon je v homogenní formě.

40

Pro klinické použití je proto rozpustný γ -interferon, připravený způsobem podle vynálezu, vůbec ne nebo přinejmenším méně antigenní než γ -interferon z inkluzních částic.

45 Průmyslová využitelnost

Rozpustné γ -interferony je možno způsobem podle vynálezu připravit v podstatně vyšším výtěžku, což rozšiřuje možnosti jejich klinické aplikace.

50

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Způsob přípravy rozpustných rekombinantních proteinů z bakterií, jejichž plazmid obsahuje kompletní gen za promotorem, při němž se tento plazmid exprimuje a získaný protein izoluje a čistí, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že

10

a) buněčná kultura se kultivuje až do OD 600 nm od 0,4 až 0,6,

b) buněčná kultura se během časové periody od 15 do 40 minut ochladí na 20 až 26 °C,

c) syntéza se indukuje přidavkem 10 až 55 μ m induktoru,

15

d) indukční fáze probíhá při teplotě od 20 do 26 °C po dobu časové periody od 3,5 do 6,5 hodiny, a

20

e) získané buněčné pelety, vzaté do pufru, se rozdělí na inkluzní částice a roztok, obsahující protein, a protein se následně izoluje z proteinového roztoku.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jsou buněčné kultury podle kroku a) kultivovány až do OD 600 nm od 0,45 až 0,55 při 35 až 38 °C.

25

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jsou buněčné kultury podle kroku b) ochlazovány během časové periody od 25 do 35 minut na 24 až 26 °C.

30

4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že syntéza podle kroku c) je indukována přidáním induktoru do výsledné koncentrace 10 až 50 μ m.

5. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že indukční fáze podle kroku d) probíhá při teplotě 24 až 26 °C po dobu časové periody od 3,5 do 5,5 hodiny.

35

6. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako bakterie používají buňky E. coli.

7. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako gen používá kompletní gen pro γ -interferon.

40

8. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako promotor používá trc-promotor.

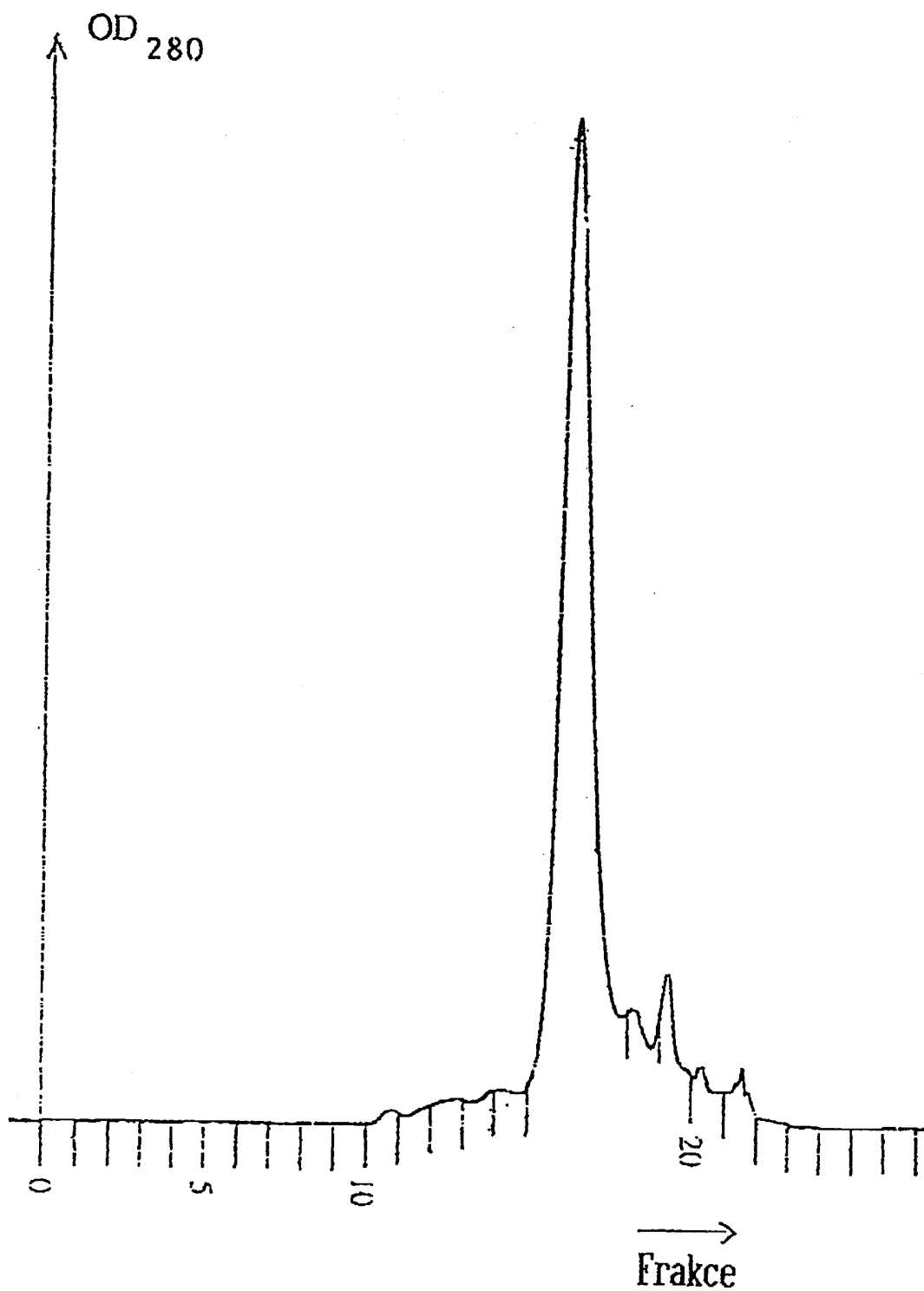
9. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako induktor používá izopropyl- β -D-tiogalaktosid (IPTG).

45

50

1 výkres

Gelová filtrace



Obr - 1

Konec dokumentu
