



19



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

11 CH 688 653 A5

51 Int. Cl.⁶: C 12N 009/70

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

21 Gesuchsnummer: 03481/95

22 Anmeldungsdatum: 03.04.1995

30 Priorität: 04.04.1994 CN 94 1 12106.2

24 Patent erteilt: 31.12.1997

45 Patentschrift
veröffentlicht: 31.12.1997

73 Patentinhaber:
Shanghai Medical University
138 Yi Xue Yuan Road
200032 Shanghai
CN-China

74 Vertreter:
Bugnion S.A.
Case postale 375
1211 Genève 12 – Champel

72 Erfinder:
Houyan Song
138 Yi Xue Yuan Road
200032 Shanghai
CN-China

86 Internationale
Anmeldung: 03.04.1995
PCT CN9500024

87 Internationale
Veröffentlichung: 12.10.1995
WO 9527050

54 Verfahren zur Herstellung rekombinanter Streptokinase.

57 Das Verfahren betrifft die Herstellung rekombinanter Streptokinase durch Verstärkung des Streptokinase-Gens mittels einer Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung bakterieller makromolekularer DNA als Schablone. Das Streptokinase-Gen wird dann an einen Vektor gebunden, Wirtsbakterien werden mit dem Expressionsvektor transformiert und diese kultiviert. Aus den geernteten Bakterien werden Einschlusskörper isoliert, welche die gebildete rekombinante Streptokinase in relativ grossen Mengen enthalten. Nach Aufarbeitung erhält man ein thrombolytisches Medikament.

Das Verfahren ist einfach und seine Kosten niedrig, und die erzielten Ausbeuten und Reinheiten sind hoch.



Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Biotechnologie. Insbesondere betrifft sie ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Streptokinase.

Heutzutage enthalten wirksame thrombolytische Medikamente menschliche gewebetypische rekombinante Plasminogenaktivatoren (rt-PA), Streptokinase (SK) und anisoylierten Plasminogen-Streptokinase-Komplex (APSAC), usw. Im September 1993 fassten Prof. Ridker und Mitarbeiter der Frauenklinik Brigham in den USA die Wirksamkeit thrombolytischer Behandlung von 100 000 Patienten mit akutem Herzinfarkt (AMI) zusammen. Die Ergebnisse zeigten, dass die genannten drei thrombolytischen Wirkstoffe keine wesentlichen Unterschiede bezüglich Wirksamkeit und Nebenwirkungen aufwiesen. rt-PA ist sehr teuer, und SK ist zehnmal billiger als rt-PA. Ausserdem war bei Verwendung von SK die Anzahl erneuter Gefässverschlüsse geringer, so dass sich SK für eine Anwendung anbietet.

Pathogenes hämolytisches *Streptococcus aureus* wurde von ausländischen Firmen als Ausgangsmaterial für natürliche Streptokinase verwendet. Es war erforderlich, Vorkehrungen gegen eine Umweltverschmutzung und für die Sicherheit des Personals zu treffen sowie die Toxine zu entfernen, welche Hypotension und Fieber verursachen. Die Verfahren und Anlagen zur Herstellung natürlicher Streptokinase waren komplex und die Herstellungskosten hoch, weil die Ausbeute an SK aus hämolytischem *Streptococcus aureus* niedrig und die Reinigung schwierig waren.

In den frühen 80er Jahren trennten J.J. Ferritti und Mitarbeiter das SK-Gen aus einem Bakterienphagen von hämolytischem *Streptococcus aureus* ab und führten die Expression des Gens aus. Die Expressionsausbeute an r-SK war so niedrig, dass nur mehrere hundert Einheiten pro ml Medium erhalten wurden. Es gelang ihm nicht, ein praktisch anwendbares genetisches Produkt zu erhalten.

Gemäss US-DD 24 898 und JP 5 317 044 wird das SK-Gen nach der Methode von Ferretti abgetrennt, aber die Expressionsvektoren und die Kulturbedingungen waren andere, und die Expression lieferte Mengen von 60 bis 274 µg entsprechend 6420 bis 29 300 Einheiten pro ml Medium. Angaben über Ausbeute an gereinigtem Produkt wurden nicht gemacht.

Auch hier erhält man keine technisch brauchbare genetische r-SK.

1993 stellte L. Herrera in Kuba rekombinante Streptokinase nach einer komplizierten genetischen Technik und Reinigungsmethode her. Die dabei verwendeten Materialien wie Plasminogen-Affinitäts-Absorbentien sind sehr teuer, und die Reinheit und Ausbeute an Produkt waren niedrig. Daher waren die Kosten der erzeugten r-SK sehr hoch.

Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung eines neuen Verfahrens zur Herstellung rekombinanter Streptokinase (r-SK) durch Bio-Hochtechnologie. Das Verfahren, welches sicher ist und das Produkt mit niedrigen Kosten und in hoher Reinheit und hoher Ausbeute liefert, ist im unabhängigen Patentanspruch 1 definiert. Besondere Ausführungsformen bilden den Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

In den Ansprüchen und in der folgenden Beschreibung bedeutet «Primer» (Starter) ein einkettiges DNA-Oligonucleotid-Fragment, welches ganz oder teilweise zur verstärkten DNA-Sequenz komplementär ist und als Ursprung der Extensionsprodukte verwendet wird. Die Länge und Sequenz des Primers muss derart sein, dass die Extension der PCR-Produkte eingeleitet wird.

Vorzugsweise enthält der Primer etwa 5 bis 50 Nucleotide. Die spezifische Länge und Sequenz werden vom jeweiligen Aufbau der Target-DNA bzw. -RNA bestimmt und auch von den Bedingungen wie Temperatur und Ionenstärke.

Die Bezeichnung «Vektor» umfasst Plasmide, Cosmide, Phagen und Viren. Bevorzugt verwendet man als Vektor ein prokaryotisches Expressionsplasmid. Die durch PCR vervielfältigten Produkte können in bestimmte Stellen der Expressionsvektoren geklont werden, wobei sich rekombinante Expressionsvektoren bilden.

Wenn der Expressionsvektor aufgebaut ist, kann er in geeignete Wirtszellen eingeschleust werden, beispielsweise durch Transformation, Transfektion, Elektroporationsfällung mit Calciumphosphat, direkte Mikroinjektion usw.

Für die Erfindung sind als Wirtszellen prokaryotische und eukaryotische Zellen geeignet. Ideale prokaryotische Wirte sind *E. coli*, *Bacillus subtilis*, usw. Der beste prokaryotische Wirt ist *E. coli*, und der ideale eukaryotische Wirt ist Hefe.

Wirtszellen mit eingeschleustem Vektor lässt man in einem selektiven Medium wachsen, und die den Expressionsvektor enthaltenden Zellen werden ausgewählt. Die ausgewählten Zellen mit dem darin enthaltenen Vektor werden dann unter geeigneten Bedingungen kultiviert und dazu veranlasst, unter bestimmten Bedingungen SK-Gene zu exprimieren. Bevorzugt wendet man zur Induktion der Expression Wärme an.

Die Expressionsprodukte der SK-Gene können durch eine Reihe von Isolierungs- und Reinigungsverfahren gereinigt werden, die dem Fachmann bekannt sind. Es wird bevorzugt, dass die Expressionsprodukte in der Wirtszelle als Einschlusskörper vorliegen, was die Reinigung vereinfacht und die Reinheit des Produktes verbessert.

Die Erfindung soll nun im einzelnen anhand von Beispielen erläutert werden.

In der Zeichnung stellen dar:

Fig. 1 die physikalische Kartographie des Expressionsvektors PLY- 4, und
 Fig. 2 die physikalische Kartographie des Expressionsvektors pSTE-SK.

Protokoll

- 5 (1) Hämolytisches Streptococcus aureus wurde aus der menschlichen Mundhöhle isoliert. Aus diesem Medium wurde SK gereinigt. Jeweils 5 Aminosäuresequenzen wurden am N- und am C-Ende der SK bestimmt. Nach diesen N- und C-terminalen Sequenzen wurden Primer aufgebaut und zur SK-Gen-Verstärkung direkt mittels PCR, worin makromolekulare bakterielle DNA als Schablone verwendet wurde,
 10 eingesetzt.
- (2) Das verstärkte SK-Gen, verifiziert durch Nucleotidsequenz-Analyse, wurde an einen prokaryotischen Expressionsvektor gebunden, der die Promotoren P_L und P_R, CIt857-Gen, das RNA-Terminalsinal 5s und andere regulierende Stoffe enthält, um ein hochwirksames Expressionsplasmid pSTE-SK-1 zu bilden.
- 15 E. coli wurde mittels pSTE-SK-1 umgewandelt. Die Expression des SK-Gens wurde über die Temperatur eingeleitet. Die in den Produktionsbakterien enthaltenen Expressionsprodukte r-SK bildeten Einschlusskörper. Das Molekulargewicht von r-SK, überprüft durch SDS-PAGE, betrug 43 000, und r-SK machte mehr als 40% der gesamten bakteriellen Proteine aus. Das Produktionsbakterium wird als STE-SK-1 bezeichnet.
- 20 (3) Das Produktionsbakterium STE-SK-1 wurde in wenig Nährmedium fermentiert, welches mit LB-Medium, Glucose und Spurenelementen vor und nach der Temperaturinduktion angereichert wurde. Die Fermentation wurde bei 30 bis 40°C, 50 bis 80%iger Sauerstoffauflösung (DO) und einem pH 6 bis 8 ausgeführt, wobei die Rührgeschwindigkeit bei steigender DO verringert wurde. Die Produktionsbakterien werden in einem Hochdruck-Homogenisator zerkleinert. Die Einschlusskörper wurden abzentrifugiert,
 25 mit Pufferlösung gewaschen und mittels Guanidin-Hydrochlorid aufgelöst. Nach zwei Reinigungsschritten wurde gereinigte r-SK erhalten. Nach dem erfindungsgemässen Verfahren wurden aus 1 Liter Fermentationsbrühe 20 bis 30 g Nassbakterien erhalten, und am Ende wurden 600 mg gereinigtes r-SK-Produkt in einer Reinheit von 97 bis 99% und mit einer spezifischen Aktivität von 100 000 IE/mg gewonnen. Zur gereinigten r-SK wurde menschliches Serumalbumin, Natriumglutamat und Phosphate gegeben, durch ein Millipore-Filter filtriert und gefrier-getrocknet. Es entstand ein weisses Pulver. Das in Reinstwasser gelöste Produkt wurde vor allem bei der Behandlung von akutem Herzinfarkt und anderen Thrombosekrankheiten verwendet.
- 30 Bei der Behandlung von akutem Herzinfarkt bei Hunden und Femurarterienverschluss bei Kaninchen (Dosis 0,3 mg/kg) ergab sich in allen Fällen eine thrombolytische Auflösung in 30 bis 60 Minuten, und die Gefässe waren wieder durchgängig. Bei der Behandlung von Hyphema von Kaninchen verschwand das Hyphema in 24 Stunden, und bei der Behandlung von intraokularer Exudation verschwand das Exudat in wenigen Stunden.
- 35 Bei der vorliegenden Erfindung wird die DNA-Technologie verwendet, um r-SK mit nichtpathogenem E. coli zu exprimieren. Das Verfahren ist sicher und schädigt die Umwelt und das Personal nicht. Wegen der hohen Wirksamkeit der Expression und der einfachen Reinigungsverfahren sind Reinheit und Ausbeuten hoch, und diese Vorteile führen zu einer starken Kostensenkung bei der Herstellung von r-SK.

Beispiel 1

- 45 1. Verstärkung des SK-Gens durch PCR

60 60 Stämme von Streptococcus aureus aus dem Spitallabor wurden gesammelt und über Nacht kultiviert. Der Stamm mit der höchsten SK-Bildung (Stamm Nr. 8) wurde weiterverwendet und kultiviert. Aus dem Kulturmedium wurde SK isoliert, und die Sequenzen von 5 N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren wurden von Hand oder maschinell analysiert. Nach den Sequenzresultaten wurden PCR-Primer aufgebaut. Ein spezifisches PCR-Band wurde mit den folgenden Primern erhalten:

55 Primer I:
 5'CGC GAA TTC GGG ATG TTT GCA CTG CTG TTT GCA 3' (EcoR I)

60 Primer II:
 5'GGC GGA TCC TTA TTT GTA TTT AGG GTT CTC AGG 3' (Bam H I)

65 Diese zwei Primer wurden nach dem Verfahren der festen Triphosphatester mit einem DNA-Synthesizer hergestellt.

Nach Reinigung wurden die Primer zur Verstärkung des SKGens verwendet. Das 5'-Ende jedes PCR-Primerpaars enthielt jeweils Endonuclease-Restriktionsstellen.

Nach der Methode von F.M. Ausubel wurde makromolekulare DNA des Streptococcus Nr. 8 hergestellt; $A_{260}/A_{280} > 2,0$.

System und Bedingungen der PCR:

DNA-Schablone	3 µl (1 µg)
Primer I	1 µl (50,0 pmol)
Primer II	1 µl (50,0 pmol)
dNTP	10 µl (2,0 mmol/l)
5 × PCR-Puffer	20 µl
dd-Wasser	64 µl
Tag-DNA-Polymerase	1 µl (25 E)

Vorgehen: Denaturation bei 90°C/60 Sekunden; Extension bei 72°C/120 Sekunden; Tempern 52°C/60 Sekunden. Nach 15 Cycles wurden weitere 25 Einheiten Tag-DNA-Polymerase zugegeben und weitere 15 Cycles ausgeführt. Nach Reaktionsende wurde eine Probe von 2,5 µl durch Agarosegel-Elektrophorese untersucht, wobei eine Bande bei 1,3 kb gefunden wurde, was mit der Länge des intakten SK-Gens übereinstimmt.

2. Aufbau und DNA-Sequenzierung des SK-Gen-Klons

Die PCR-Produkte und pUC-19-Plasmid wurden mit Hilfe der gleichen Restriktions-Endonuclease hydrolysiert, bei Zimmertemperatur mit T4-DNA-Ligase gemischt und 1 Stunde stehengelassen. Das Gemisch wurde zur Transformation von E. coli JM 83, ausgebreitet auf Ampicillin-LB-Platten verwendet und die Platten zwecks Selektivkultur bei 37°C inkubiert.

Eine Kolonie wurde zur Herstellung des Plasmids aufgenommen. Nach mehreren Analysen auf Restriktions-Endonucleasen erhielt man das Plasmid pST-1 mit spezifischem Fragment.

Nucleotid-Sequenzierung des Plasmids pST-1: Wegen einer Hind-III-Stelle im SK-Gen wurden zwei Subklone mit Fragmenten von 770 bp bzw. 570 bp aufgebaut. Mittels einer Nucleotid-Sequenzierung wurde die Rahmenstruktur des SK-Gens bestätigt. Die Ergebnisse der Bestimmung sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Nucleotidsequenzen des SK-Gens und davon
abgeleitete Sequenzen der Aminosäuren

5	ATG	AAA	AAT	TAC	TTA	TCI	TTT	GGG	ATG	TTT	GCA	CTG	CTG	TTI
	Met	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ser	Phe	Gly	Met	Phe	Ala	Leu	Leu	Phe
10	GCA	TTA	ACA	TTT	GGA	ACA	GTC	AAG	CCT	GTC	CAA	GCT	ATT	GCT
	Ala	Leu	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Lys	Pro	Val	Gln	Ala	Ile	Ala
	GGG	ICT	GAG	IGG	CTG	CTA	GAC	CGT	CCA	ICT	GTC	AAC	AAC	AGC
	Gly	Ser	Glu	Trp	Leu	Leu	Asp	Arg	Pro	Ser	Val	Asn	Asn	Ser
15	CAA	TTA	GTT	GTT	AGC	GTT	GCT	GGT	ACT	GTT	GAG	GGG	ACG	AAT
	Gln	Leu	Val	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Gly	Thr	Asn
	CAA	GAC	ATT	AGT	CTT	AAA	TTT	TTT	GAA	ATT	CAC	CTA	ACA	ICA
	Gln	Asp	Ile	Ser	Leu	Lys	Phe	Phe	Glu	Ile	His	Leu	Thr	Ser
20	CGA	CCT	GCT	CAC	GGA	GGA	AAG	ACA	GAG	CAA	GGC	TTA	AGT	CCA
	Arg	Pro	Ala	His	Gly	Gly	Lys	Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro
	AAA	ICA	AAA	CTA	TTT	GCT	ACT	GAT	AGT	GGC	GCG	ATG	CCA	AAT
	Lys	Ser	Lys	Leu	Phe	Ala	Thr	Asp	Ser	Gly	Ala	Met	Pro	Asn
25	AAA	CTT	GAA	AAA	GCT	GAC	TTA	CTA	AAG	GCT	ATT	CAA	GAA	CAA
	Lys	Leu	Glu	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Ile	Gln	Glu	Gln
	TTG	ATC	GCT	AAC	GTC	CAC	AGT	AAC	GAC	GAC	TAC	TTT	GAG	GTC
	Leu	Ile	Ala	Gln	Val	His	Ser	Asn	Asp	Asp	Try	Phe	Glu	Val
30	ATT	GAT	TTT	GCA	AGC	GAT	GCA	ACC	ATT	ACT	GAT	CGA	AAC	GGC
	Ile	Asp	Phe	Ala	Ser	Asp	Ala	Thr	Ile	Thr	Asp	Arg	Asn	Gly
	AAG	GTC	TAC	TTT	GCT	GAC	AAA	GAT	GGT	ICG	GTA	ACC	TTG	CCG
	Lys	Val	Try	Phe	Val	Asp	Lys	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Leu	Pro
35	ACC	CAA	CCT	GTC	CAA	GAA	TTT	TTG	CTA	AGC	GGA	CAT	GTC	CGC
	Thr	Gln	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	His	Val	Arg
40	GTT	AGA	CCA	TAT	AAA	GAA	AAA	CCA	ATA	CAA	AAT	CAA	GCG	AAA
	Val	Arg	Pro	Tyr	Lys	Glu	Lys	Pro	Ile	Gln	Asn	Gln	Ala	Lys
	ICT	GTT	GAT	GTG	GAA	TAT	ACT	GTA	CAG	TTT	ACT	CCC	TTA	AAC
	Ser	Val	Asp	Val	Glu	Try	Thr	Val	Gln	Phe	Thr	Pro	Leu	Asn
45	CCT	GAT	GAC	GAT	TTC	AGA	CCA	GGT	CTC	AAA	GAT	ACT	AAG	CTA
	Pro	Asp	Asp	Asp	Phe	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu
	TTG	AAA	ACA	CTA	GCT	ATC	GGT	GAC	ACC	ATC	ACA	ICT	CAA	GAA
	Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Ile	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Ser	Gln	Glu
50	TTA	CTA	GCT	CAA	GCA	CAA	AGC	ATT	TTA	AAC	AAA	ACC	CAC	CCA
	Leu	Leu	Ala	Gln	Ala	Gln	Ser	Ile	Leu	Asn	Lys	Thr	His	Pro
	GGC	TAT	ACG	ATT	TAT	GAA	CGT	GAC	TCC	TCA	ATC	GTC	ACT	CAT
	Gly	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Glu	Arg	Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Thr	His
55	GAC	AAT	GAC	ATT	TTC	CGT	ACG	ATT	TTA	CCA	ATG	GAT	CAA	GAG
	Asp	Asn	Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Ile	Leu	Pro	Met	Asp	Gln	Glu
60	TTT	ACT	TAC	CAT	GTC	AAA	AAT	CGG	GAA	CAA	GCT	TAT	GAA	ATC
	Phe	Thr	Tyr	His	Val	Lys	Asn	Arg	Glu	Gln	Ala	Tyr	Glu	Ile
	AAT	AAA	AAA	ICT	GGT	CTG	AAT	GAA	GAA	ATA	AAC	AAC	ACT	GAC
	Asn	Lys	Lys	Ser	Gly	Leu	Asn	Glu	Glu	Ile	Asn	Asn	Thr	Asp

65

	CTG	ATC	ICT	GAG	AAA	TAT	TAC	GTC	CTT	AAA	AAA	GGG	GAA	AAG
	Leu	Ile	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Leu	Lys	Lys	Gly	Glu	Lys
5	CCG	TAT	GAT	CCC	TTT	GAT	CGC	AGT	CAC	TTC	AAA	CGT	TTC	ACC
	Pro	Tyr	Asp	Pro	Phe	Asp	Arg	Ser	His	Leu	Lys	Leu	Phe	Thr
	ATC	AAA	TAC	GTT	GAT	GTC	AAC	ACC	AAC	GAA	TTC	CTA	AAA	AGC
10	Ile	Lys	Tyr	Val	Asp	Val	Asn	Thr	Asn	Glu	Leu	Leu	Lys	Ser
	GAG	CAG	CTC	TTA	ACA	GCT	AGC	GAA	CGT	AAC	TTA	GAC	TTC	AGA
	Glu	Gln	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Glu	Arg	Asn	Leu	Asp	Phe	Arg
15	GAT	TTA	TAC	GAT	CCT	CGT	GAT	AAG	GCT	AAA	CTA	CTC	TAC	AAC
	Asp	Leu	Tyr	Asp	Pro	Arg	Asp	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Tyr	Asn
	AAT	CTC	GAT	GCT	TTT	GGT	ATT	ATG	GAC	TAT	ACC	TTA	ACT	GGA
	Asn	Leu	Asp	Ala	Phe	Gly	Ile	Met	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Gly
20	AAA	GTA	GAG	GAT	AAT	CAC	GAT	GAC	ACC	AAC	CGT	ATC	ATA	ACC
	Lys	Val	Glu	Asp	Asn	His	Asp	Asp	Thr	Asn	Arg	Ile	Ile	Thr
	GTT	TAT	AGT	GGC	AAG	CGA	CCC	GAA	GGA	GAG	AAT	GCT	ACG	TAT
	Val	Tyr	Ser	Gly	Lys	Arg	Pro	Glu	Gly	Glu	Asn	Ala	Ser	Tyr
25	CAT	TTA	GCC	TAT	GAT	AAA	GAT	CGT	TAT	ACC	GAA	GAA	GAA	CGA
	His	Leu	Ala	Tyr	Asp	Lys	Asp	Arg	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Arg
	GAA	GTT	TAG	AGC	TAC	CTG	CGT	TAT	ACA	GGG	ACA	CCT	ATA	CCT
	Glu	Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Thr	Gly	Thr	Pro	Ile	Pro
30	GAG	AAC	CCT	AAA	GAC	AAA	TAA							
	Glu	Asn	Pro	Lys	Asp	Lys								

3. Expression des SK-Gen-Klons in E. coli

Konstruktion des Expressionsvektors: Das Gen LacZ an der Stelle LacZ des Vektors pGEM(3Z) wurde entfernt, und in das pGEM(3Z) wurde ein Gen Clt857, Promotor P_R und P_L, ein Fragment mit multiplen Restriktionsstellen einem RNA-Terminalsinal 5s und Terminalcoden t₁ und t₂ eingebunden, wie es in Fig. 1 gezeigt ist.

Konstruktion des Expressionsplasmids: Das Plasmid pST-1 wurde mit zwei Restriktions-Endonucleasen digeriert und mittels Agarosegel-Elektrophorese abgetrennt. Ein SK-Gen mit 1,3 kb wurde gewonnen und gereinigt und dann mit einem Expressionsvektor verbunden.

E. coli K802 wurde mit dem Verbindungsgemisch nach der Calciumphosphatmethode transformiert und in einem selektiven Ampicillin-Medium auf Platten kultiviert. Aus der selektierten Einzelkolonie wurden die Plasmide gewonnen und mittels Restriktions-Endonucleasen identifiziert. Das Plasmid, welches die spezifischen Fragmente des SK-Gens enthielt, wurde als Expressionsplasmid pSTE-SK-1 bezeichnet und das Produktionsbakterium als STE-SK-1.

4. Expression des SK-Gens in E. coli

Eine Einzelkolonie von STE-SK-1 wurde aufgenommen und über Nacht in flüssigem LB-Medium bei 30°C und Schütteln mit 200/min kultiviert. Das Gemisch wurde mit dem Medium im Verhältnis 1:100 verdünnt und bei 30°C geschüttelt, bis A₆₀₀ etwa 0,6 betrug (etwa 4 bis 5 Std.). Dann wurde die Temperatur innerhalb 3 bis 4 Minuten auf 42°C gebracht, wonach noch 3 bis 4 Std. geschüttelt wurde. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren bei 5000/min gewonnen, zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und bei -20°C aufbewahrt, oder die Expressionsprodukte wurden sofort isoliert.

5. Identifizierung der Expressionsprodukte

Es wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Expressionsrate von r-SK verwendet, und Umkehrfibrinplatten wurden zur Identifizierung der fibrinolytischen Aktivität von r-SK eingesetzt.

Die zur Solubilisierung der Probe verwendete Lösung enthielt 0,0626M Tris-HCl (pH 6,7), 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoethanol und 0,001% Bromphenolblau.

Vorbereitung und Aufnahme der Probe

1 ml induzierte Bakteriensuspension wurde zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl der obigen Lösung suspendiert und in kochendem Wasser 5 min erhitzt, worauf sich das Sediment auflöst. Proben, die bezüglich Chromatographiepeak übereinstimmen, wurden mit 2 Volumina der obigen Lösung vermischt und erwärmt. Die Aufnahmemenge beträgt 10 µl. Vergleichsbakterien und Bakterien vor der Induktion wurden auf gleiche Weise behandelt.

Anfärben der Gele: mit Coomassie Brilliantblau oder Silbersalzen.

Scannen der Proteinbanden: Das Gel wurde in einem Doppelwellenlängen-Scanner-Densitometer Shimadzu CS-9100 gescannt. Die Ergebnisse wurden im Computer verarbeitet und lieferten Daten jeder Proteinbande in Prozent der gesamten Bakterienproteine.

Ergebnisse: Sehr dunkle Bande mit 15 kD in den Lysaten der induzierten Bakterien entsprechend einem Molekulargewicht von 43 000; diese Bande fehlte in den Vergleichsbakterien und den nicht induzierten Bakterien. Es ergab sich, dass die r-SK mehr als 65% der gesamten Bakterienproteine ausmachte.

Identifizierung der fibrinolytischen Aktivität der Expressionsprodukte: Das vorgenannte Gel wurde mit 2,5%iger Triton-X-100-Lösung und normaler Salzlösung zwecks Entfernung von SDS gewaschen und dann auf Agarosegel gebracht, welches Fibrinogen, menschliches Plasminogen und Thrombin enthielt. Dann wurde bei 37°C 2 Std. lang inkubiert. Es bildete sich eine Lysezzone im Gel, wo sich die 43-kD-Bande befand, da das Fibrin an dieser Stelle aufgelöst wurde. Dies bedeutet, dass das Expressionsprodukt eine fibrinolytische Aktivität aufwies.

Status des im Bakterium befindlichen Expressionsproduktes: Die Bakterien wurden im Hochdruckhomogenisator oder durch Ultraschall zerstört und dann zentrifugiert. Die Sedimente und das Überstehende wurden durch SDS-PAGE identifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass die 43-kD-Bande im Sediment, aber nicht im Überstand erscheint. Dies bedeutet, dass das Expressionsprodukt r-SK Einschlusskörper bildete.

Bestimmung der spezifischen Aktivität von r-SK:

Zur Bestimmung der Aktivität der r-SK wurde die Fibrinogelplatte, eine Chromogensubstrat-Analyse oder die Auflösung von Fibringerinnseln verwendet, und die Proteinkonzentration wurde mit der Lowry-Methode bestimmt. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten r-SK pro Volumeinheit (E) bezogen auf den Proteingehalt in der Volumeinheit (mg) angegeben.

6. Fermentierung der Produktionsbakterien

Fermentierung im Schüttelkolben:

Eine Einzelkolonie von STE-SK-1 wurde in LB-Medium inokuliert, bei 30°C über Nacht inkubiert, am nächsten Tag mit verbessertem Medium M9 1:50 verdünnt, sobald ein Wert A_{600} von 0,6 bis 0,8 erreicht war, und 3 bis 4 Std. induziert. Die Bakteriensuspension wurde bei 5000/min 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden mit PBS (pH 7,4) gewaschen, gewogen und bei 20°C gelagert.

5-Liter-Fermenter NBS:

Eine Einzelkolonie von STE-SK-1 wurde in 100 ml LB-Medium inokuliert, bei 30°C über Nacht inkubiert, dann wurde A_{600} bestimmt. Die Lösung wurde als Inokulat zur Fermentation verwendet.

Der Fermenter wurde bei 120°C und 15 psd 15 Minuten ausgedämpft. Nach dem Abkühlen wurden die folgenden Werte eingestellt: Temperatur 30°C, pH 6 bis 8, Sauerstoffauflösung (DO) 50 bis 80%, Rühren 225 bis 800/min (wechselt mit dem DO-Wert). Nach Einregelung dieser Werte wurde die STE-SK-1-Suspension eingefüllt und mit Nährlösung im Verhältnis 1:50 verdünnt. Nach Erreichen eines A_{600} -Wertes von etwa 0,6 wurde die Fermentierung unter Induktionsbedingungen ohne Änderung der angegebenen Parameter 3 bis 4 Std. fortgesetzt. Die Bakterien wurden geerntet und bei -20°C aufbewahrt.

7. Reinigung der r-SK

(1) 4 g Produktionsbakterien wurden in 25 ml hypotonischer Pufferlösung (0,05M Tris-HCl pH 7,8 – 0,2M EDTA – Lysozym 0,5 mg/ml) suspendiert, bei Zimmertemperatur 60 min lang gerührt, und dann wurde Triton X-100 auf 2% und NaCl auf 0,5M zugegeben. Die Bakterien wurden im Homogenisator zerstört, bei 8000/min 60 Minuten bei 10°C zentrifugiert und dreimal mit Pufferlösung (0,05M Tris-HCl pH 7,8, 0,02M EDTA) gewaschen. Die Sedimente wurden gesammelt und in 20 ml Wasser suspendiert, gegen Wasser dialysiert und das Retentat zur Auflösung der Einschlusskörper mit Harnstoff auf 4M versetzt.

(2) Isolierung von r-SK durch Elektrofokussierung im Rotofor und Gewinnung von r-SK

In 49 ml der vorstehenden Lösung der Einschlusskörper wurde 1 ml Ampholin (pH 3-10) gegeben. Nach 4 Std. Elektrofokussierung im Rotofor (12 W, 4°C) wurden Proben aus jeder Kammer durch SDS-PAGE identifiziert. Die SK-haltigen Lösungen wurden vereinigt, zur Entfernung des Harnstoffes gegen 0,05M PBS vom pH 7,4 + 0,02M EDTA dialysiert, mit Aminosäuren-Solubilisierungspuffer verdünnt und 72 Std. bei 4°C stehengelassen. Nach Zentrifugieren bei 8000/min wurde der Überstand gesammelt und durch Ultrafiltration konzentriert.

(3) Gelfiltration und Filtrationssterilisierung

Die durch Ultrafiltration konzentrierte Probe wurde auf eine mit Aminosäuren-Solubilisierungspuffer stabilisierte Sephacryl-200-Säule gegeben und diese mit einer Rate von 1 ml/min eluiert. Mittels eines Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatographieapparats Econo überwachte Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE auf Reinheit und spezifische Aktivität untersucht. Die Produktionslösung wurde über 0,2-µm-Millipore filtriert, durch Filtration über 2,2 µm Millipore sterilisiert und gefriergetrocknet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2.

Ergebnisse der Reinigung von r-SK

	Protein (mg)	Aktivität ($\times 10^6$)	spez. Aktivität (IE/mg)	Reinigungs- faktor	Aktivität (%)
Bakterien, nass	–	7,8	540	–	100
Einschlusskörper	101	5,6	5 500	10,1	72
ROTOFOR-Reinigung	46	4,4	95 000	175	57
Sephacryl S-200	32	3,2	100 000	185	41

Beispiel 2

1. Aufbewahrung der Produktionsbakterien

Das Inokulum wurde im Tiefkühler bei –70 °C gelagert.
Die physikalische Karte des Plasmids wurde regelmässig überprüft, und es wurde bestimmt, ob die Expressionsrate bei 65% stabil blieb.

2. Kultur der Produktionsbakterien

Medium LB-Amp-Platte: Hefeextrakt 5 g, Trypton 10 g, NaCl 5 g, Agar 10 g, mit Wasser auf 1000 ml. Sterilisierung im Autoklav 20 min bei 1 kg/cm², Ampicillinzugabe nach dem Abkühlen.
Flüssiges LB-Medium: Gleich wie oben, aber kein Agar und Ampicillin.
Die Inokulatbakterien wurden dem Tiefkühler entnommen auf die Platte (enthaltend 100 µg/ml an Ampicillin) inokuliert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Von der Platte wurde eine Einzelkolonie entnommen, ins LB-Medium inokuliert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Dieses erste Inokulat wurde im Verhältnis von 1:10 in LB-Medium gebracht und bei 30°C über Nacht inkubiert, wodurch das zweite Inokulat erhalten wurde.

3. Fermentierung

Nach dem Sterilisieren des Fermenters wurde das Medium eingefüllt. Nach Erreichen des stationären Zustandes wurde das zweite Inokulat im Verhältnis 1:10 zugegeben und die Fermentierung unter Luft-einleiten ausgeführt.

Bei der Fermentierung wurden die folgenden Bedingungen eingehalten: 30°C, pH 6–8, DO 50–80%. Die Rührgeschwindigkeit wurde dem DO-Wert angepasst. Jede Stunde wurden 5 ml Bakterien zur Bestimmung der Dichte (OD₆₀₀) und der Glucosekonzentration entnommen.

Das pH des Mediums wurde mit wässrigem Ammoniak auf 6–8 eingestellt. Falls nötig wurde ein Entschäumer zugegeben.

Vor und nach der Induktion werden Trypton, Glucose und Spurenelemente nachgesetzt.

Nach der Induktionskultur während 3–4 Std. wurde die Fermentierung abgebrochen, wenn ein OD-Wert von 600 erreicht war, die Bakterien wurden geerntet, zentrifugiert, gewogen und sofort zur Isolierung der Einschlusskörper zerstört. Alternativ wurden die Bakterien bei –70°C aufbewahrt.

4. Aufbrechen der Bakterien

Nasse Bakterien wurden in einer Pufferlösung suspendiert und unter Druck durch einen Homogenisator geleitet. Der Aufbrechungsgrad wurde zuvor mikroskopisch wie folgt bestimmt: Die Suspension wurde verdünnt, auf eine nach Gram angefärbte Glasplatte gebracht, und es wurde die Anzahl A an Bakterien in 4 Feldern ermittelt. Die gleiche Prozedur wurde mit der Suspension nach der Homogenisierung ausgeführt und ergab die Zahl B. Der Anteil an aufgebrochenen Bakterien ist dann $(A-B)/A \cdot 100$ (%). Wenn dieser Wert 95% überstieg, wurde zentrifugiert und die aus Einschlusskörpern bestehende Fällung gesammelt. Die Reinheit von r-SK betrug über 75–85% der gesamten bakteriellen Proteine.

5. Reinigung der Einschlusskörper

Die erhaltenen Einschlusskörper wurden mehrmals gewaschen, und die Reinheit der r-SK betrug über 90% der gesamten bakteriellen Proteine.

6. Lösung und Gewinnung von r-SK

Die gereinigten Einschlusskörper wurden mit Hilfe von Guanidinhydrochlorid gelöst und bei 10 000/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mehrmals gegen PB dialysiert und bei 20'000/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Die Reinheit der r-SK beträgt über 95% mit einer spezifischen Aktivität von 65 000 IE/mg; die Ausbeute an r-SK liegt über 65%.

7. Reinigung

Ionenaustausch-Chromatographie: Man verwendete einen Chromatographieapparat Waters 650 oder Econo. Die gewonnene r-SK wurde auf eine Anionenaustauschersäule, stabilisiert mit PB, mit einer Geschwindigkeit von 1,0 ml/min gegeben. Es wurde mit PB mit einem linearen pH-Gradienten eluiert (4,00 ml/min). Der erste Eluatpeak (r-SK) wurde gesammelt.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass die Reinheit der r-SK 94% bei einer spezifischen Aktivität von 80 000 IE/mg betrug. Die Ausbeute an r-SK ist > 55% und die Proteinkonzentration 7 mg/ml.

Gelfiltration: Das Gel wurde in endotoxin- und bakterienfreiem entionisiertem Wasser gequollen, sterilisiert, in die Säule gefüllt und mit PB stabilisiert. Die über 2,2 µm Millipore filtrierten Proben wurden auf die Säule gegeben und mit PB bei 5,0 ml/min eluiert. Die Aktivität der r-SK wurde mittels Fibrinogel-Auflösung überwacht und die Rohre mit dem Aktivpeak wurden vereinigt. Die spezifische Aktivität des Produktes betrug etwa 100 000 IE/mg. Aus 1 Liter Brühe konnten etwa 600 mg gereinigtes Produkt mit einer Reinheit von 97–99% gewonnen werden. Die Ausbeute an r-SK war etwa 40–50%.

8. Bakterienfreie Filtration, Konditionierung, Gefriertrocknung

Je nach Proteinkonzentration und Aktivität der r-SK wurden die folgenden Hilfsmittel zugegeben:

r-SK	500 000 IE
Phosphate:	
Na_2HPO_4	1,33 mg
NaH_2PO_4	0,31 mg
Natriumglutamat zur Injektion	30 mg/Ampulle
menschliches Albumin	30 mg/Ampulle

Bakterienfreie Sterilisierung: Für die Reinheit 100 wird die Zubereitung durch ein Millipore-Filter von 0,22 µm filtriert.

Es wurden Aliquote mit 500 000 oder 1 500 000 IE pro Ampulle abgefüllt. Dann wurde gefriergetrocknet, die Ampullen verschlossen und verpackt. Die Aufbewahrung geschieht bei 8–12°C im Kühlschrank.

Durch Angiographie wurde festgestellt, dass rekombinante Streptokinase ein wirksames Mittel zur Behandlung von Femurarterien-Thrombose und Koronararterien-Thrombose bei Hunden ist.

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung rekombinanter Streptokinase (r-SK), gekennzeichnet durch
 - Aufbau von Primern nach den Nucleotidsequenzen von Streptokinase in hämolytischem Streptococcus aureus, Verstärkung des Streptokinase-Gens durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung bakterieller makromolekularer, Streptokinase-Gen enthaltender DNA als Schablone;
 - Bindung des Streptokinase-Gens an prokaryotische Expressionsvektoren unter Bildung eines rekombinanten Expressionsvektors;

(3) Transformation von Wirtsbakterien mit dem rekombinanten Expressionsvektor und Selektion der transformierten Wirtsbakterien;

(4) Kultivierung der transformierten Wirtsbakterien unter Induzierung der Expression des Streptokinase-Gens; und

(5) Isolierung und Reinigung des exprimierten Streptokinase-Gens.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Primer entsprechend den N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen der Streptokinase aufgebaut werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Primer die folgenden sind:

5'CGC GAA TTC GGG ATG TTT GCA CTG CTG TTT GCA 3' (EcoR I) und

5'GGC GGA TCC TTA TTT GTA TTT AGG GTT CTC AGG 3' (Bam H I) .

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Streptococcus aureus aus der menschlichen Mundhöhle gewonnen wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Streptokinase-Gen mit dem prokaryotischen Plasmid PLY-4 als Expressionsvektor kombiniert wird, welches P_L- und P_R-Promotoren, ein Gen Clt857, ein RNA-Terminalsinal 5s enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als transformiertes Wirtsbakterium E. coli verwendet und die Expression des Streptokinase-Gens durch die Temperatur gestartet wird, und dass das Expressionsprodukt in den Wirtsbakterien in Form von Einschlusskörpern vorliegt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die mit Expressionsplasmid transformierten Produktionsbakterien fermentiert werden, dass LB, Glucose und Spurenelemente mehrmals vor und nach dem Start zugegeben werden, und dass die Fermentation bei 30 bis 42°C, 50- bis 80%iger Sauerstoffauflösung und einem pH von 6 bis 8 vorgenommen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bakterien nach der Fermentation aufgebrochen und die Einschlusskörper gesammelt, mit Puffer gewaschen und mit Guanidinhydrochlorid gelöst werden und die r-Streptokinase durch Ionenaustausch und Gelfiltration gewonnen wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur gereinigten Streptokinase menschliches Albumin und andere Stabilisatoren zugegeben werden, wonach durch Filtration sterilisiert und dann gefriergetrocknet wird, um das Endprodukt zu erhalten.

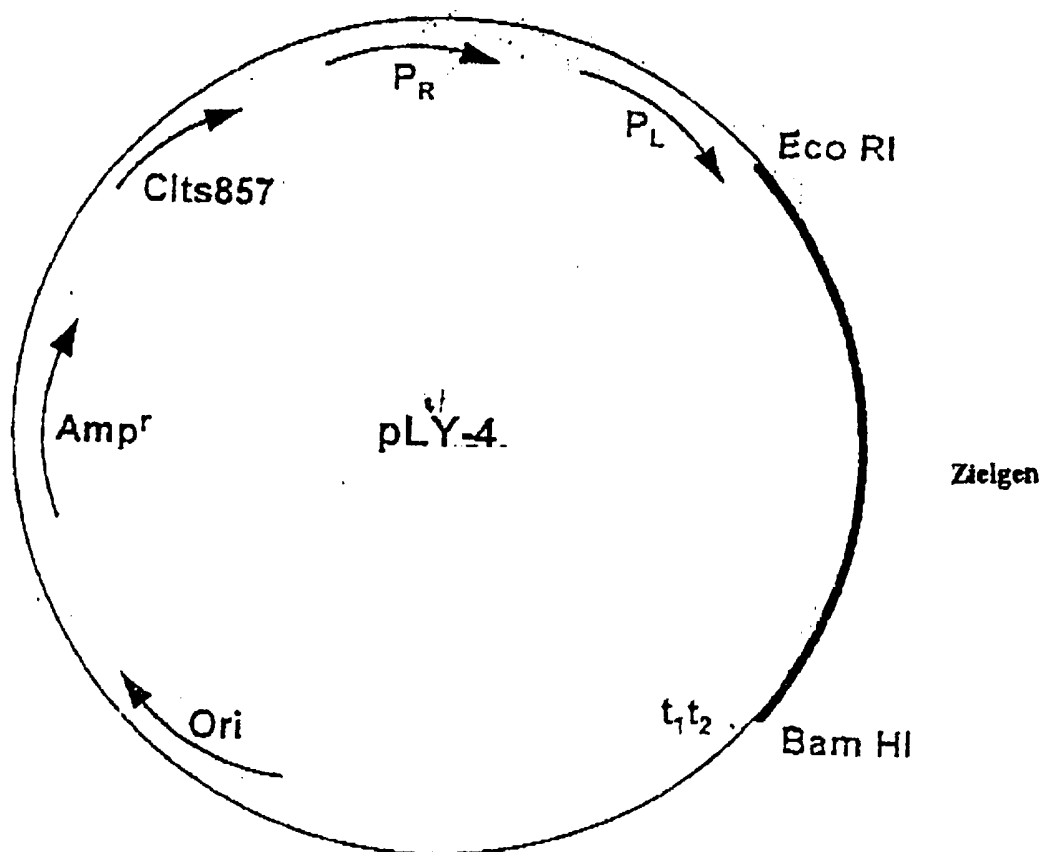


Abb. 1

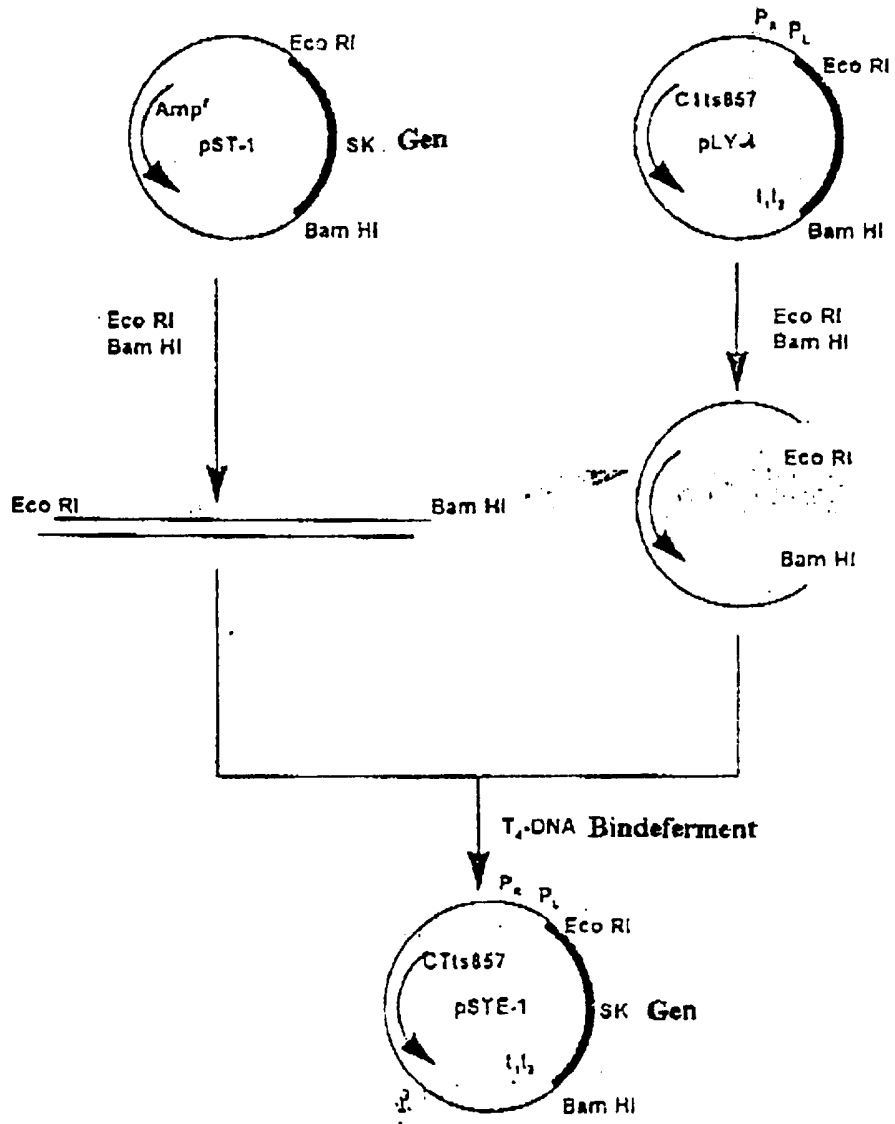


Abb. 2