(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 33 563 T2** 2006.02.16

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 828 842 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 33 563.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/04811**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 912 620.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/038570**
(86) PCT-Anmeldetag: **11.04.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **05.12.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.03.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.02.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/62*** (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
464176 **02.06.1995** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Genetics Institute, LLC, Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679 München

(72) Erfinder:
VICIK, M., Steven, Natick, US; SCHAUER, L., Neil, Milford, US; MERCER, R., James, Derry, US; LEVALLIE, R., Edward, Tewksbury, US; BRIASCO, A., Catherine, Burlington, US; DEETZ, S., Jeffrey, Melrose, US; WINTERS, Dwight, Camarillo, US; THOMAS, L., Jenifer, Salem, US

(54) Bezeichnung: **NEUES VERFAHREN ZUR GEWINNUNG UND REINIGUNG VON FUSIONSPROTEINEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein neuartige Proteingewinnungs- und Reinigungsverfahren und spezieller neuartige Verfahren für die Gewinnung und Reinigung von Thioredoxin-ähnlichen Fusionsproteinen, insbesondere von IL-11.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das Aufkommen von Rekombinant-Technologie ermöglicht nun die Herstellung von hohen Graden an Proteinen innerhalb geeignet transformierter Wirtszellen. Wo die Wirtszelle das Protein von Interesse nicht abscheidet ist es notwendig, das Protein aus den Zellen freizusetzen und das Protein dann zu reinigen.

[0003] Der anfängliche Schritt bei der Reinigung eines intrazellulären Proteins ist Freisetzung des Proteins zum extrazellulären Medium. Dies wird typischerweise unter Verwendung von mechanischen Zerreißtechniken erreicht, wie Homogenisierung oder Mahlen mit einer Perlenreibmühle. Während das Protein von Interesse im Allgemeinen wirksam freigesetzt wird, haben solche Techniken mehrere Nachteile. Engler, Protein Purification Process Engineering, Harrison Hrsg., 37–55 (1994). Temperaturanstiege, welche häufig während der Verarbeitung auftreten, können Inaktivierung des Proteins ergeben. Darüber hinaus enthält die sich ergebende Suspension ein breites Spektrum an verunreinigenden Proteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden. Nukleinsäuren und Polysaccharide erhöhen Lösungsviskosität und komplizieren potentiell nachfolgende Verarbeitung durch Zentrifugation, Querstromfiltration oder Chromatographie. Komplexe Verbindungen dieser Verunreinigungen mit dem Protein von Interesse können das Reinigungsverfahren verkomplizieren und unannehmbar niedrige Ausbeuten zur Folge haben. Als solche erleichtern selektivere Mittel zur Freisetzung intrazellulärer Proteine weitere nachfolgende Verarbeitung. Es ist von mehreren Techniken berichtet worden, dass sie Zellen durchdringbar machen und/oder intrazelluläre Proteine extrahieren. Diese Verfahren schließen die Verwendung von Lösungsmitteln, Detergenzien, chaotropen Wirkstoffen, Antibiotika, Enzymen und Chelatbildnern ein, um Zelldurchlässigkeit zu erhöhen und/oder Extraktion zu fördern. von Zugaben bestimmter Verbindungen wie Glycin zum Fermentationsmedium während des Kulturwachstums ist ebenfalls berichtet worden, dass es Freisetzung bestimmter intrazellulärer Enzyme fördert. Letztendlich ist von Techniken wie Frost-Tau-Behandlung oder osmotischem Schock ebenfalls gezeigt worden, dass sie Untergruppen von intrazellulären Proteinen freisetzen. Jedoch sind diese Techniken nicht unbedingt auf alle intrazellulären E. coli Proteine anwendbar und alle haben begrenzte Anwendung für Herstellung im großen Maßstab und/oder weitere Nachteile.

[0004] Während zum Beispiel Lösungsmittel wie Toluol und Chloroform Freisetzung von intrazellulären Proteinen fördern, sind diese Substanzen bekannt dafür, dass sie toxisch und/oder karzinogen sind. Belter et al., Bioseparations – Downstream Processing for Biotechnology: 77–94 (1988). Ames. J. of Bact. 160: 1181–1183 (1984). Windholtz et al., The Merck Index, 10. Auflage: 300 & 1364 (1983). Naglak et al., Separation Processes in Biotechnology, Asentjo Hrsg.: 177–205 (1990). Ionische Detergenzien wie SDS denaturieren isolierte Proteine häufig unumkehrbar (Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 3. Auflage, Cantor Hrsg., 22–43 (1994)). Obwohl nicht-ionische Detergenzien wie Triton X-100 oder Triton X-114 normalerweise nicht denaturierend sind, sind die gewonnenen Proteine häufig mit Detergens-Mizellen verbunden, was zusätzliche Verarbeitung erfordern kann, um Detergens-freies Protein zu ergeben, Scopes, supra. Chaotrope Wirkstoffe wie Harnstoff und Guanidin-hydrochlorid können bei den Konzentrationen denaturierend sein, die für vollständige Freisetzung erforderlich sind (Naglak et al., supra, Hettwer, Biotechnology and Bioengineering 33: 886–895 (1989)). Ihre Wirksamkeit kann von der Wachstumsphase der Kultur abhängen (Ingram, L., Bacteriol. 146: 331–336 (1981)). Antibiotika wie Polymyxin B., welche die Durchlässigkeit von E. coli beeinflussen (Hancock, Ann. Rev. Microbiol. 38: 237–264 (1984)) werden aufgrund allgemeiner Bedenken bei der Verwendung von Antibiotika in Herstellungsverfahren in der pharmazeutischen Industrie typischerweise nicht verwendet. Die Verwendung von Lysozym, welches ein relativ sanftes Mittel der Proteinfreisetzung vorsieht, ist aufgrund der relativ hohen Kosten des Enzyms beschränkt (Belter et al., supra, Naglak et al., supra) und aufgrund der nachfolgenden Erfordernis, das Protein von Interesse von dem Enzymreagens zu reinigen (Naglak et al., supra). Zusätzlich leiden Chelatbildner, welche häufig verwendet werden, um die Wirksamkeit anderer Techniken zum Durchdringbarmachen/Freisetzen zu verstärken, wie Lysozym (Naglak et al., supra, Bucke, Principles of Biotechnology, Wiseman Hrsg.: 151–171 (1983)), Toluol (De Smet et al., Biochim. Biophys. Acta 506: 64–80 (1978)) oder Triton X-100 (Leive, Annals New York Academy of Sciences 235: 109–129 (1974)) Extraktion, häufig unter dem Nachteil der nicht-spezifischen Freisetzung des Proteins von Interesse. Zum Beispiel setzt die Verwendung von Chelator bis zu 18% intrazelluläres E. coli Protein frei und kann unerwünschte Komplexbildung mit Lipopolysacchariden (LPS) und Phosphatidyl-ethanolamin ergeben, Naglak et al., supra bei 185.

[0005] Die Verwendung anderer Verfahren zur Proteinfreisetzung hat ebenfalls Nachteile. Zum Beispiel erfordert osmotischer Schock, bei welchem Zellen in einem Medium mit hoher Osmolalität suspendiert, zurückgewonnen und nachfolgend in einen Puffer mit niedriger Osmolalität platziert werden (Nossal et al., J. Biol. Chem. 241: 3055–3062 (1966)) zusätzliche Verarbeitungsschritte bezüglich weiterer Extraktionsalternativen (Moir et al., Separation Processes in Biotechnology, Asenjo Hrsg.: 67–94 (1990)) oder macht die Handhabung großer Flüssigkeitsvolumina bei niedrigen Temperaturen erforderlich (Naglak et al., supra). Dies macht das Verfahren für Verarbeitung im großen Maßstab unattraktiv. Frost-Tau-Behandlung setzt ebenfalls intrazelluläre Proteine frei, jedoch ergeben relativ niedrige Ausbeuten häufig multiple Zyklen oder zusätzliche Verarbeitungsanforderungen (Naglak et al., supra; Bucke, supra). Zusätzlich ist das Gefrieren von Zellpaste eine hinzugefügte, nicht-triviale Verarbeitungsanforderung im Vergleich mit anderen Extraktionsalternativen. Zum Schluss sind Reagenzien wie Glycin während der Fermentation zugegeben worden, um Proteinfreisetzung zum extrazellulären Medium zu fördern (Aristidou et al., Biotechnology Letters 15: 331–336 (1993)). Während von partieller Freisetzung von mehreren intrazellulären Proteinen berichtet worden ist, erfordert diese Herangehensweise direkte Kopplung von Fermentation und Freisetzungsstrategien und nachfolgende Abtrennung des Proteins von Interesse aus einer potentiell komplexen, extrazellulären Brühe.

[0006] Sobald das Protein aus der Wirtszelle freigesetzt ist, ist Reinigung des Proteins von Interesse von weiteren Zellbestandteilen erforderlich. Unglücklicherweise setzen die meisten Extraktions-Herangehensweisen wie Zelllysis das Protein nicht nur potentiellem Zerfall durch Wirtszellen-Proteanen aus, sondern machen die Isolierung des Proteins von anderen Elementen der sich ergebenden Suspension auch schwieriger. Zum Beispiel erfordert das Vorhandensein von negativ geladenen Molekülen wie DNA, RNA, Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) häufig die Verwendung von Anionen-Austausch Chromatographie (Sassenfeld, TIBTECH 8: 88–93 (1990); Spears, Biotechnology Vol. 3 – Bioprocessing, Rehm Hrsg.: 40–51 (1993)) und/oder Ausfällung mit Polykationen wie Protaminsulfat (Kelley et al., Bioseparation 1: 333–349 (1991); Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 2. Auflage, Cantor Hrsg., 21–71 (1987)), Streptomycinsulfat (Wang et al. Hrsg., Fermentation and Enzyme Technology: 253–256 (1979)), Polyethylenimin (PEI) (Kelley et al., supra.; Sassenfeld, supra) und/oder wässerige Zwei-Phasen-Extraktion mit nicht mischbaren Polymersystemen wie Polyethylenglycol (PEG)/Phosphat oder PEG/Dextran (Kelley et al., supra, Strandberg et al., Process Biochemistry 26: 225–234 (1991)). Alternativ kann das Protein von Interesse durch die Zugabe eines neutralen Salzes wie Ammoniumsulfat oder Kaliumchlorid weg von nicht-proteinhaltigen polyanionischen Verunreinigungen ausgefällt werden (Wheelwright, Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing: 87–98 (1991); Englard et al., Methods in Enzymology Band 182, Deutscher Hrsg.: 285–300 (1990)) und/oder eines Polymers wie PEG oder Dextransulfat (Wang et al., supra, Wheelwright, supra). Wo das Protein von Interesse positiv geladen ist, wird es dazu neigen, sich an alle vorhandenen negativ geladenen Moleküle zu binden, und dadurch Reinigung des Proteins praktisch unmöglich machen.

[0007] Typischerweise haben Forscher die oben beschriebenen, anfänglichen Fraktionierungsschritte genutzt, um die Anstoß erregenden Polyanionen vom Protein von Interesse zu trennen. Unglücklicherweise leidet jedes dieser anfänglichen Trennverfahren unter mehreren Nachteilen, insbesondere wenn es bei der Herstellung von pharmazeutischen Reagenzien verwendet wird. Zum Beispiel neigen die großen Mengen an nicht-proteinhaltigen polyanionischen Verunreinigungen, welche in bakteriellen Lysaten gefunden werden, dazu, die Bindungskapazitäten von Anionen-Austausch Chromatographieharzen zu verringern. Zusätzlich werden Regenerierungsprotokolle als Folge von hartnäckiger Bindung der Polyanione an die Harze häufig unwirksam gemacht (Spears, supra). Zum Schluss sind die Bedingungen von geringer ionischer Stärke, die Proteinbindung begünstigen, beim Zerreißen von Polyanion-Protein Interaktionen unwirksam und ergeben einen Mangel an Trennung (Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 3. Auflage, Cantor Hrsg. 171 (1994)). Protaminsulfat-Präparate werden von Bedenken gegenüber Protease und viralen Verunreinigungen geplagt. Darüber hinaus kann unerwünschte Proteinausfällung bei Verwendung dieses Reagenses auftreten (Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 2. Auflage, Cantor Hrsg., 21–71 (1987)). Bei der Verarbeitung von pharmazeutischen Proteinen wird Streptomycinsulfat aufgrund der allgemeinen Besorgnis bezüglich der Verwendung von Antibiotika als Verfahrensreagenzien im Allgemeinen nicht verwendet (Scawen et al., Handbook of Enzyme Biotechnology, 2. Auflage, Wiseman Hrsg.: 15–53 (1985)). PEI-Präparate sind häufig mit variierenden Mengen an Ethylenimin-Monomer verunreinigt, einem Wirkstoff, der unter Krebsverdacht steht (Scawen et al., supra). PEI neigt ebenfalls dazu, sich unumkehrbar an viele Chromatographieharze zu binden, und beschränkt damit seine Wirksamkeit und die Anzahl an potentiellen Chromatographieharzen, die zur Verwendung als Nach-PEI-Klärung verfügbar sind. Im Allgemeinen sind wässerige, Zwei-Phasen Extraktionssysteme schwer vorherzusehen und erfordern häufig eine empirische Herangehensweise zur Bestimmung von Bedingungen, die das Protein von Interesse in die passende wässerige Phase bewegen (Kelley et al., supra). Techniken, die das Protein von Interesse spezifisch ausfällen, ergeben häufig den Einschluss der nicht-proteinhaltigen Verunreinigungen in der Ausfällung, was die Trennung unwirksam macht (Scopes, supra; Wheelwright,

Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing: 87–98 (1991)).

[0008] Ensprechend besteht fortgesetzt ein Bedarf beim Stand der Technik an sowohl wirksamen Proteinfreisetzungsverfahren (die Freisetzung von nicht-proteinhaltigen Verunreinigungen minimieren und eliminieren), als auch wirksamen Reinigungsverfahren (die nicht-proteinhaltige Verunreinigungen, insbesondere polyanionische Verunreinigungen entfernen) und an einem gesamten Freisetzungs- und Reinigungsverfahren, dass leicht in großem Maßstab ausgeführt wird.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Durch die vorliegende Erfindung wird ein Verfahren zum Reinigen eines Proteins von Interesse vorgesehen, wobei ein Protein vor der Spaltung negativ geladen ist und einen Thioredoxin-Fusionspartner umfasst, und besagtes Protein von Interesse nach der Spaltung positiv geladen ist, welches die Schritte umfasst:
Binden von besagtem negativ geladenen Protein an ein erstes Anionen-Austauschharz,
Eluieren von besagtem negativ geladenen Protein mit einem ersten Eluent, um ein erstes Eluat zu bilden,
Auftragen von besagtem ersten Eluat auf ein erstes Kationen-Austauschharz,
Sammeln von besagtem negativ geladenen Protein in einer ungebundenen Fraktion von besagtem ersten Kationen-Austauschharz,
Spalten von besagtem negativ geladenen Protein, um ein positiv geladenes Protein zu bilden,
Binden von besagtem positiv geladenen Protein an ein zweites Kationen-Austauschharz,
Eluieren von besagtem positiv geladenen Protein mit einem zweiten Eluent, um ein zweites Eluat zu bilden,
Auftragen von besagtem zweiten Eluat auf ein zweites Anionen-Austauschharz und
Sammeln von besagtem positiv geladenen Protein in einer ungebundenen Fraktion von besagtem zweiten Anionen-Austauschharz.

[0010] Proteine der vorliegenden Erfindung können entweder in einer transformierten Wirtszelle, z.B. E. coli, rekombinant hergestellt und von der Wirtszelle gereinigt werden, oder können von löslichen Quellen wie Plasma, Urin und Ähnlichem gereinigt werden. Wenn sie von löslichen Quellen gereinigt werden, kann der anfängliche Freisetzungsschritt, welcher einen Chelator nutzt, weggelassen werden und die Reinigung kann direkt mit der Zugabe der zweiwertigen Kationen/Alkohollösung wie oben beschrieben beginnen.

[0011] Das Protein von Interesse kann gereinigt werden, indem man einen Unterschied im pI des Proteins von Interesse im Vergleich zum pI des Fusionsproteins und Fusionspartners nutzt. Vor der Spaltung des Fusionsproteins werden zwei komplementäre Ionen-Austauschharze Rücken an Rücken genutzt und nach Spaltung des Fusionsproteins werden zwei zusätzliche komplementäre Ionen-Austauschharze Rücken an Rücken genutzt. Das Reinigungsverfahren nutzt die Tatsache, dass der pI des Fusionsproteins, also des Fusionspartners, gebunden an das Protein von Interesse, nicht der gleiche ist, wie der pI des Proteins von Interesse ohne den Fusionspartner.

[0012] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein adsorptiver Schritt mit einem nicht-adsorptivem Schritt gekoppelt, um gegensätzlich geladene Moleküle unter den eingesetzten Bedingungen rigoros zu entfernen, und um die Wirksamkeit und Selektivität zu verstärken, welche durch die Spaltungsumsetzung verliehen wird. Dies bedingt sowohl Wahl von passenden Harzen, als auch die entsprechende Optimierung von pH und Bedingungen ionischer Stärke, um den pI-Unterschied von Fusionsproteinen gegenüber dem Protein von Interesse und dem Fusionspartner wirksam einzusetzen. Um das Fusionsprotein zu reinigen ist es wünschenswert, den pH so nahe am pI zu haben, um so gegensätzlich geladene Verunreinigungen auszuschließen; nach Spaltung ist es wünschenswert, den pH so nahe am pI des Proteins von Interesse zu haben, um alle gegensätzlich geladenen Verunreinigungen auszuschließen. Typischerweise sieht Anpassen des pH nur in den Chromatographieschritten nicht den erforderlichen Grad der Entfernung von Verunreinigungen vor. Entsprechend sieht die Erfindung die Zugabe von nicht-adsorptiven Schritten als „ionische Filter" vor, um die erforderlichen Log-Entfernungen von Verunreinigungen zu erhalten. Die besonderen Kombinationen von gewählten komplementären Ionenaustauschharzen sehen viel größere Reinigungsgrade vor, als es mit traditioneller Ionenaustausch-Methodik möglich ist.

[0013] Gemäß dem Verfahren der Erfindung wird das Thioredoxin-ähnliche Fusionsprotein an ein erstes Harz gebunden, eluiert, auf ein zweites Harz aufgetragen (an welches es sich nicht bindet) und wird in der ungebundenen Fraktion gesammelt; als nächstes wird das Thioredoxin-Fusionsprotein gespalten und das gespaltene Protein wird an ein drittes Harz gebunden, eluiert, auf ein viertes Harz aufgetragen und in ungebundener Fraktion aus dem vierten Harz gesammelt. Wenn die ersten und vierten Harze Anionen-Austauschharze sind, sind die zweiten und dritten Harze Kationen-Austauschharze. Wenn die ersten und vierten Harze Kationen-Aus-

tauschharze sind, sind die zweiten und dritten Harze Anionen-Austauschharze. Die Harze werden basierend auf dem pI des Fusionsproteins und dem pI des Proteins von Interesse ausgewählt. Zum Beispiel wo das Fusionsprotein vor Spaltung negativ geladen ist und das Protein von Interesse nach Spaltung positiv geladen ist, sind die ersten und vierten Harze Anionen-Austauschharze und die zweiten und dritten Harze Kationen-Austauschharze. Alternativ sind, wo das Fusionsprotein vor Spaltung positiv geladen ist und das Protein von Interesse nach Spaltung negativ geladen ist, die ersten und vierten Harze Kationen-Austauschharze und die zweiten und dritten Harze sind Anionen-Austauschharze. Geeignete Anionen-Austauschharze haben positiv geladene Gruppen wie Diethylaminoethan (DEAE), Polyethylenimin (PEI) und quaternäres Aminoethan (QAE). Geeignete Kationen-Austauschharze haben negativ geladene Gruppen wie Sulfonyl, Sulfylpropyl (SP), Carboxyl und Carboxymethyl.

[0014] Ebenfalls wird durch die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Reinigen von IL-11 vorgesehen, welches einbezieht: Bindung von Thioredoxin-IL-11 an ein erstes Anion-Austauschharz wie Toyopearl QAE, Eluieren mit einem ersten Eluent (wobei die bevorzugten Eluenten 20–100 mM Tris-Puffer bei pH 7,5–8,5 einschließen, welche 100–500 mM NaCl enthalten, und 50–200 mM Hisidin-Puffer bei pH 5,5–6,6, welche 0–150 mM NaCl enthalten, wobei der am meisten bevorzugte Eluent 75 mM Histidin, 75 mM NaCl bei pH 6,2 ist), Auftragen dieses Eluats auf ein erstes Kationen-Austauschharz wie S-Sepharose Fast Flow, Sammeln des Thioredoxin-IL-11 in einer ungebundenen Fraktion, dann Spalten des Thioredoxin-IL-11 Fusionsproteins, um positiv geladenes IL-11 zu bilden, Binden an ein zweites Kationen-Austauschharz wie CM Sepharose Fast Flow (wobei die bevorzugten Eluenten 50–300 mM Glycin-Puffer bei pH 9,0–10,0 einschließen, welche 100–500 mM NaCl enthalten, wobei der am meisten bevorzugte Eluent 150 mM Glycin, 150 mM NaCl, pH 9,5 ist), Auftragen dieses zweiten Eluats auf ein zweites Anionen-Austauschharz wie Toyopearl QAE und dann Sammeln des IL-11 in der ungebundenen Fraktion.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0015] Für die Herstellung in großem Maßstab eines Proteins, welches rekombinant hergestellt worden ist, wird Protein typischerweise zuerst aus der Zelle freigesetzt. Proteine können als Fusionsproteine hergestellt werden, zum Beispiel als Thioredoxinfusion in E, coli, und von ihnen wird angenommen, dass sie auf Stellen gerichtet sind, an welchen durch Einfluss des Thioredoxin-Fusionspartners die inneren und äußeren Zellmembranen angrenzend werden, welche manchmal als Bayer's-Patches bezeichnet werden. Wirtszellen werden unter Verwendung eines Chelators wie Tris-EDTA selektiv durchlässig gemacht, um das Fusionsprotein von Interesse freizusetzen. Andere Chelatoren als EDTA können ebenfalls verwendet werden, zum Beispiel DPTA, EGTR, CDTA, Zitrat und Ähnliches. Das Verfahren wird für die Konzentrationsbandbreite des Chelators, die Temperatur der Umsetzung, als auch den pH und die ionische Stärke der Lösung leicht optimiert, wie es gut innerhalb den Fähigkeiten eines Fachmanns ist. Wie ein Fachmann leicht anerkennt, wird die passende Konzentration an Chelator gemäß der Art der gelösten Substanz, pH der Lösung, Lösungstemperatur, ionischen Stärke der Lösung und dem molaren Anteil an Chelator zu Metallchelat variieren. Bevorzugt werden wässerige Lösungen mit einem pH zwischen 2 und 11, einer Temperatur zwischen 10°C und 60°C, der ionischen Stärke zwischen 0 und 1 und dem molaren Verhältnis von Chelator zu Chelat im Bereich von 0,1:1,0 bis 1,0:0,1. Optimale Bedingungen können durch einen Fachmann durch Überwachen der Freisetzung des Proteins von Interesse aus den Wirtszellen leicht ermittelt werden. Typischerweise reichen Chelator-Endkonzentrationen von 0,1 mM zu 100 mM, wobei 15 mM bevorzugt werden. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform ist die Temperatur vor der Zugabe des Chelators wesentlich kühler als nach der Zugabe des Chelators, zum Beispiel geht sie von etwa 3°C auf etwa 37°C.

[0016] Lipopolysaccharide in der äußeren Membran von gram negativen Bakterien bilden ionische Interaktionen mit Magnesium und/oder Calciumionen (Vaara, Microbiological Reviews 56: 395–411 (1992); Hancock, Ann. Rev. Microbiol. 38: 237–264 (1984); Felix, Anal. Biochem. 120: 211–234 (1982). Vermutlich wirkt der Chelator auf zweiwertige Ionen, z.B. Magnesium- und Calciumionen als Gegen-Ion zu negativ geladenen Gruppen. Dies führt zu Dissoziation, welche ihrerseits zur Erzeugung von Lücken in der Membran führt, welche die selektive Freisetzung des Fusionsproteins ermöglichen.

[0017] Nach Freisetzung des Fusionsproteins in das Medium kann die zelluläre Debris falls gewünscht entfernt werden, zum Beispiel durch Zentrifugation. Jedoch ist ein Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass sie keine Entfernung von zellulärer Debris erfordert, wie es üblicherweise bei anderen Klärungsverfahren benötigt wird. In Lösung vorhanden sind negativ geladene Moleküle wie DNA, RNA, Phospholipide und Lipopolysaccharide, als auch das Fusionsprotein von Interesse. Wo das Fusionsprotein von Interesse positiv geladen ist, wird es an alle negativ geladenen Moleküle binden, was Reinigung des Proteins praktisch unmöglich macht. Den Fachleuten gut bekannt ist die Verwendung von Polyethylenimin (PEI) für die Entfernung von DNA (Sca-

wen et al., supra). Unglücklicherweise ist PEI immer mit Restmengen des Monomers Ethylenimin (EI) verunreinigt (Scawen et al., supra), welches durch OSHA als Krebs-verdächtiges Mittel klassifiziert worden ist. Die Entfernung der negativ geladenen Moleküle aus der Lösung kann unter Nutzung eines Gemisches aus einem oder mehreren zweiwertigen Kationen wie Magnesium, Mangan und/oder Calcium plus Alkohol erreicht werden, also Mg^{++}/ROH, wo R für eine kurze Kohlenstoffkette mit 1 bis 4 Kohlenstoffen in der Länge steht, wie Methyl, Ethyl und die verschiedenen Isomere von Propyl, als auch sekundäres Butyl und tertiäres Butyl, wobei Ethyl bevorzugt wird. Zweiwertige Kationen werden typischerweise als Salze mit Gegen-Anionen zugegeben, wie Chlorid, Sulfat, Acetat und Ähnliches. Diese zweiwertige Kationen/Alkohollösung wird manchmal hierin einfach als die „Alkohollösung" bezeichnet.

[0018] Nach Zugabe der Alkohollösung verbleibt das meiste, wenn nicht das gesamte Protein von Interesse in Lösung, während die Verunreinigungen aus der Lösung ausfällen und eine nicht-lösliche Fraktion bilden. Dieser Schritt ist ebenfalls Konzentrations-, pH-, Temperatur- und Zeit-abhängig. Verlängerte Inkubation unter optimalen Bedingungen kann unumkehrbare Ausfällung des Proteins von Interesse ergeben. Erhöhte Temperaturen und/oder Alkoholkonzentrationen und/oder pH-Extreme können Ausfällung von Protein erhöhen. Temperaturen unter 50°C und Alkohol-Endkonzentrationen zwischen 5 und 30% werden bevorzugt, wobei 32°C und 14% (Volumen/Volumen-%) Ethanol am meisten bevorzugt wird.

[0019] Nicht ausreichende zweiwertige Kation- und/oder Alkoholkonzentrationen führen zu unwirksamer Klärungsentfernung von nicht-proteinhaltigen Verunreinigungen. Vorzugsweise beträgt die Endkonzentration des zweiwertigen Kations 1 bis 1000 mM oder 50 bis 300 mM, wobei 50 bis 200 mM die am meisten bevorzugte Bandbreite ist.

[0020] Gegebenenfalls können für erhöhte Klärung Mangan- und/oder Calciumsalze zur Mg^{++}/ROH-Lösung bei einer Endkonzentration von 1 bis 1000 mM zugegeben werden, so dass die Gesamtmolarität im Bereich von 1 bis 1000 mM oder 50 bis 300 mM verbleibt, wobei gegenwärtig erwogen wird, dass der am meisten bevorzugte Bereich 50 bis 200 mM beträgt. Wenn multiple zweiwertige Kationen genutzt werden, summieren sich bevorzugte Endkonzentrationen auf 50 bis 200 mM Salz und schließen zum Beispiel 125 mM Magnesium plus 75 mM Calcium oder Mangan oder verschiedene Kombinationen daraus ein, zum Beispiel etwa 125 mM Magnesium plus etwa 38 mM Mangan und etwa 38 mM Calcium. Wie hierin verwendet bedeutet der Begriff „Molarität" die Anzahl an Gramm Molekulargewichten einer Verbindung, gelöst in einem Liter Lösung.

[0021] Zugabe der Alkohollösung entfernt mehr als 80–90% der DNA und LPS-Moleküle aus der Lösung. Die sich ergebende Lösung kann dann weiter behandelt werden, um das Protein von Interesse aus der Lösung zu entfernen. Zum Beispiel kann das Protein von Interesse unter Verwendung von Zink (Zn^{++}) Salzen wie Zinkchlorid, Zinksulfat, Zinkacetat und Ähnlichem ausgefällt werden. Der sich ergebende Niederschlag kann konzentriert werden und durch Fest/Flüssig-Abscheidetechniken einschließlich Zentrifugation und Filtration gewonnen werden. Ausgefälltes Protein kann nachfolgend durch einen Chelatbildner wie EDTA, DPTA, EGTA, CDTA oder Citrat gelöst und weiter gereinigt werden. Gegebenenfalls kann der Niederschlag vor Lösung gelagert werden. Das Verfahren kann bezüglich Zinkkonzentration, Chelator zu Metallkonzentration, pH, Temperatur und Zeit optimiert werden, wie durch die Fachleute leicht anerkannt werden wird, und kann für das Protein von Interesse leicht angepasst werden. Wie nach Stand der Technik bekannt, kann unumkehrbare Proteinausfällung in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol und Aceton stattfinden (Pennell, The Plasma Proteins Volume 1, Putnam Hrsg.: 9–42 (1960); Wang et al., Fermentation and Enzyme Technology: 253–256 (1979); Wheelwright, Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing: 87–98 (1991); Scopes, Protein Purificatian Principles and Practice, 2. Auflage, Cantor Hrsg. 21–71 (1987)). Dieses Phänomen wird typischerweise durch Betreiben bei niedrigeren Temperaturen für eine kürzere Dauer minimiert. Bevorzugte Bedingungen für Ausfällung des Proteins von Interesse sind im Allgemeinen pH = 6,0 bis 8,5, 1 bis 500 mM Zn^{++}, eine Temperatur unter 20°C und Dauer von weniger als 24 Stunden. Die am meisten bevorzugten Bedingungen sind Ausfällung bei pH = 7,0 und 0°C für 15 Minuten bei einer $ZnCl_2$ Endkonzentration von 50 mM.

[0022] Nachfolgend wird der Niederschlag durch Fest/Flüssig-Abscheideverfahren gewonnen, welche nach Stand der Technik bekannt sind, welcher dann effizient gelagert werden kann. Bei diesem Verarbeitungsstadium befindet sich das Protein nicht länger in Lösung und ist gegenüber Proteolyse weniger anfällig. Zusätzlich ist das Protein wenigstens eine Höhenordnung konzentriert, was leicht gefrorene Langzeitlagerung (circa 2 Monate) bei –20°C bis –80°C für Zwischenverbindungen in Prozessen in großem Maßstab ermöglicht. Entsprechend dient dieser Schritt der Entkopplungsgewinnung aus Reinigungsanteilen des Verfahrens.

[0023] Vor der weiteren Verarbeitung wird der Proteinniederschlag mit einem Chelatbildner gelöst. Bevorzug-

te Lösungsbedingungen sind pH = 6,5 bis 11, Temperatur unter 40°C und ein Molverhältnis von Chelator pro Mol Zn^{++} von etwa 0,5 bis 1000. Am meisten bevorzugt wird Lösung bei pH = 8,0 und 20°C unter Verwendung des Chelators EDTA bei einem Verhältnis von 5–100 Mol EDTA pro Mol Zn^{++}. Typischerweise werden mehr als 70% des Proteins von Interesse durch Ausfällung, Fest-Flüssig-Abscheidung und Lösungsverfahren gewonnen.

[0024] Das Fusionsprotein von Interesse kann weiter gereinigt werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann Reinigung unter Verwendung von zwei Ionenaustauschharzen vor Spaltung des Fusionsproteins erreicht werden, gefolgt von zwei Ionenaustauschharzen nach Spaltung des Fusionsproteins. Das Verfahren setzt wirksam jeden Unterschied im pI des Fusionsproteins, also des Fusionspartners, gebunden an das Protein von Interesse, zum pI des Proteins von Interesse ohne Fusionspartner ein. Zum Beispiel wenn das Protein von Interesse als Fusionspartner exprimiert worden ist, und wenn die fusionierte Form des Proteins einen pI hat, der sich wesentlich vom pI der gespaltenen Form unterscheidet (zum Beispiel wenn die fusionierte Form des Proteins einen basischen pI hat und wenn die gespaltene Form einen sauren pI hat, oder umgekehrt die fusionierte Form sauer ist und die gespaltene Form basisch ist), ist es möglich, diesen Unterschied im pI für die Reinigung der gespaltenen Form unter Verwendung von komplementären Ionenaustauschharzen vorteilhaft zu nutzen.

[0025] Spezieller wird das Fusionsprotein zuerst mit dem passenden Typ an Ionenaustauschharz gereinigt, zum Beispiel einem Anionen-Austauschharz, um ein negativ geladenes Fusionsprotein zu binden (oder umgekehrt einem Kationen-Austauschharz, um ein positiv geladenes Fusionsprotein zu binden). Als nächstes wird der komplementäre Typ an Ionenaustauschharz verwendet, um weitere Verunreinigungen aus dem Verfahrensstrom mit einem pI und einer Nettoladung beim pH des Arbeitsgangs zu entfernen, der sich von der fusionierten Form des Proteins unterscheidet. Zum Beispiel kann im Fall eines Fusionsproteins mit einem sauren pI ein Kationen-Austauschharz unter Bedingungen verwendet werden, also wenn der pH größer als der pI für das Fusionsprotein ist, bei welchen das Fusionsprotein ohne Bindung durch das Harz fließt, während das Harz Verunreinigungen mit pIs größer als der pH des Arbeitsgangs bindet (oder umgekehrt im Fall eines Fusionsproteins mit einem basischen pI kann ein Anionen-Austauschharz unter Bedingungen verwendet werden, also wo der pH kleiner als der pI der Fusion ist, bei welchen das Fusionsprotein ohne Bindung durch das Harz fließt, während das Harz Verunreinigungen mit pIs kleiner als der pH des Arbeitsgangs bindet). Die pH-Anforderungen können durch die Zugabe von Verbindungen modifiziert werden, welche die ionische Stärke der Lösung verändern, wie es durch die Fachleute der Ionenaustausch-Chromatographie verstanden wird. Das Fusionsprotein wird einfach in der ungebundenen Fraktion gesammelt, welche auch manchmal als Durchflussfraktion bezeichnet wird. Es sind diese komplementären Kombinationen von Ionenaustausch-Reinigungen, die ein Präparat aus Fusionsprotein ergeben, das von Verunreinigungen mit deutlich anderen pIs gereinigt worden ist.

[0026] Als nächstes kann das Fusionsprotein in die einzelnen Proteine gespalten werden, nämlich das Protein von Interesse mit einem signifikant anderen pI von dem der fusionierten Form und dem Fusionspartner. Reinigung des Proteins von Interesse kann dann mit zusätzlichen Anwendungen von Ionenaustausch-Chromatographie fortschreiten. Wo einmal die fusionierte Form an das Harz gebunden hat, fließt das gespaltene Protein von Interesse nun ohne Bindung durch das Harz, während Verunreinigungen (einschließlich nicht gespaltenes Fusionsprotein und/oder der Fusionspartner, welcher der Teil des freigesetzten Proteins von Interesse während Spaltung ist), an das Harz binden (oder umgekehrt, wenn einmal die fusionierte Form ohne Bindung durch das Harz floss, bindet nun das gespaltene Protein von Interesse an das Harz, Verunreinigungen jedoch nicht). Speziell werden die Produkte der Spaltungsumsetzung zuerst aufgetragen, zum Beispiel auf ein Kationen-Austauschharz (wo das gespaltene Protein positiv geladen ist oder umgekehrt auf ein Anionen-Austauschharz, falls das Produktprotein negativ geladen ist). Als nächstes wird das komplementäre Ionenaustauschharz, zum Beispiel ein Anionen-Austauschharz (oder umgekehrt ein Kationen-Austauschharz) unter Bedingungen verwendet, wo das gespaltene Protein ohne Bindung durch das Harz fließt, während die negativ geladenen Verunreinigungen (umgekehrt, positiv geladenen Verunreinigungen) an das Harz binden. Das Protein von Interesse wird im Durchfluss gesammelt. Wieder reinigen diese zusätzlichen Ionenaustausch-Kombinationen Verunreinigungen weg, welche deutlich unterschiedliche pIs von dem Protein von Interesse haben.

[0027] Viele Kombinationen von komplementären Ionenaustauschharzen sind möglich. In Tabelle 1 unten werden acht Variationen dargestellt, vier für den Fall eines negativ geladenen Fusionsproteins (mit einem positiv geladenen, gespaltenen Protein) und vier für den Fall eines positiv geladenen Fusionsproteins (mit einem negativ geladenen gespaltenen Protein).

Tabelle 1

Komplementäre Ionenaustauschkombinationen

Negativ geladenes Fusionsprotein

Positiv geladenes gespaltenes Protein

I	II	III	IV
Anionen-Austausch (Bindung)	Kationen-Austausch (keine Bindung)	Kationen-Austausch (keine Bindung)	Anionen-Austausch (Bindung)
↓	↓	↓	↓
Kationen-Austausch (keine Bindung)	Anionen-Austausch (Bindung)	Anionen-Austausch (Bindung)	Kationen-Austausch (keine Bindung)
↓	↓	↓	↓
Spalten	Spalten	Spalten	Spalten
↓	↓	↓	↓
Kationen-Austausch (Bindung)	Kationen-Austausch (Bindung)	Anionen-Austausch (keine Bindung)	Anionen-Austausch (keine Bindung)
↓	↓	↓	↓
Anionen-Austausch (keine Bindung)	Anionen-Austausch (keine Bindung)	Kationen-Austausch (Bindung)	Kationen-Austausch (Bindung)

Positiv geladenes Fusionsprotein

Negativ geladenes gespaltenes Protein

V	VI	VII	VIII
Kationen-Austausch (Bindung)	Anionen-Austausch (keine Bindung)	Anionen-Austausch (keine Bindung)	Kationen-Austausch (Bindung)
↓	↓	↓	↓
Anionen-Austausch (keine Bindung)	Kationen-Austausch (Bindung)	Kationen-Austausch (Bindung)	Anionen-Austausch (keine Bindung)
↓	↓	↓	↓
Spalten	Spalten	Spalten	Spalten
↓	↓	↓	↓
Anionen-Austausch (Bindung)	Anionen-Austausch (Bindung)	Kationen-Austausch (keine Bindung)	Kationen-Austausch (keine Bindung)
↓	↓	↓	↓
Kationen-Austausch (keine Bindung)	Kationen-Austausch (keine Bindung)	Anionen-Austausch (Bindung)	Anionen-Austausch (Bindung)

[0028] Die bestimmte gewählte Variation hängt davon ab, welche Konfiguration von komplementären Austauschharzen die größte Reinigungseffizienz vorsieht. Zum Beispiel ist für die Reinigung von Thioredoxin-IL-11 überraschend gefunden worden, dass die erste Konfiguration (I) die effizienteste Reinigung ergibt. Bestimmte positiv geladene Verunreinigungen binden sich unerwartet an das erste Anionen-Austauschharz und werden zusammen mit dem Thioredoxin-IL-11 Fusionsprotein eluiert. Diese positiv geladenen Verunreinigungen binden dann an das folgende Kationen-Austauschharz, während das Thioredoxin-IL-11 Fusionsprotein dieses nicht macht und einfach durchfließt. So kann es für bestimmte Anwendungen zu bevorzugen sein, eine Konfiguration vor Spaltung zu wählen, bei welcher das Fusionsprotein im ersten Schritt gebunden wird, dadurch wird

es den meisten Verunreinigungen erlaubt, in der Durchflussfraktion zu verbleiben. Ähnlich kann es vorteilhaft sein, eine Konfiguration nach Spaltung zu wählen, bei welcher das gespaltene Protein von Interesse im ersten Schritt nach Spaltung gebunden wird, dadurch wird der Mehrheit der Verunreinigungen erlaubt, in der Durchflussfraktion zu verbleiben.

[0029] Geeignete Eluente, um das Protein von Interesse aus dem Anionen-Austauschharz zu eluieren, sind einem Fachmann gut bekannt und schließen zum Beispiel jede gepufferte Lösung ein, welche in der Lage ist, den pH beim gewünschten Wert zu halten, und auch von 0 bis 1,0 M eines ionischen Salzes enthält, welches in der Lage ist, Desorption des Proteins aus dem Harz zu verursachen.

[0030] Geeignete Eluenten, um das Protein von Interesse aus dem Kationen-Austauschharz zu eluieren, sind dem Fachmann gut bekannt und schließen zum Beispiel jede gepufferte Lösung ein, welche in der Lage ist, den pH beim gewünschten Wert zu halten, und auch von 0 bis 1,0 M eines ionischen Salzes enthält, welches in der Lage ist, Desorption des Proteins aus dem Harz zu verursachen.

[0031] Die DNA-Sequenz, welche für ein heterologes Peptid oder Protein kodiert, ausgewählt für Expression in einem rekombinanten System, wird wünschenswerter Weise an eine Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenz zur Expression in der Wirtszelle fusioniert. Eine Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenz wird hierin als eine DNA-Sequenz definiert, welche für ein Protein oder Fragment eines Proteins kodiert, welches durch eine Aminosäuresequenz mit mindestens 30% Homologie mit der Aminosäuresequenz von E. coli Thioredoxin gekennzeichnet ist. McCoy et al., USPN 5292646; erteilt am 8. März 1994, offenbart eine E. coli Thioredoxin-Sequenz (SEQ ID Nr. 22 darin). Alternativ wird eine Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenz hierin als eine DNA-Sequenz definiert, welche für ein Protein oder Fragment eines Proteins kodiert, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine dreidimensionale Struktur hat, welche der von humanem oder E. coli Thioredoxin im Wesentlichen ähnlich ist und gegebenenfalls dadurch, dass es einen Active-Site-Loop enthält. Die DNA-Sequenz von Glutaredoxin ist ein Beispiel für eine Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenz, welche für ein Protein kodiert, das solche wesentlichen Ähnlichkeiten in der dreidimensionalen Konformation aufweist und einen Cys ... Cys Active-Site-Loop enthält. Die Aminosäuresequenz von E. coli Thioredoxin wird in H. Eklund et al., EMBO, J. 3: 1443–1449 (1984) beschrieben. Die dreidimensionale Struktur von E. coli Thioredoxin wird in **Fig.** 2 von A. Holmgren, J. Biol. Chem. 264: 13963–13966 (1989) skizziert. In **Fig.** 1 von McCoy et al. supra umfassen Nukleotide 2242–2568 eine DNA-Sequenz, welche für das E. coli Thioredoxinprotein kodiert (Lim et al, J. Bacteriol., 163: 311–316 (1985)) (McCoy et al, supra). Ein Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von E. coli Thioredoxin und Glutaredoxin wird in Xia, Protein Science 1: 310–321 (1992) veröffentlicht. Diese vier Veröffentlichungen sehen Informationen über Thioredoxin-ähnliche Proteine vor, die einem Fachmann bekannt sind.

[0032] Als das primäre Beispiel für ein Thioredoxin-ähnliches Protein, welches in dieser Erfindung brauchbar ist, hat E. coli Thioredoxin die folgenden Merkmale. E. coli Thioredoxin ist ein kleines Protein, nur 11,7 kD, und kann bis zu hohen Graden hergestellt werden (> 10%, entsprechend einer Konzentration von 15 μM falls Zellen bei 10 A_{550}/ml lysiert werden). Die kleine Größe und Kapazität für eine hochgradige Synthese des Proteins trägt zu einer hohen intrazellulären Konzentration bei. E. coli Thioredoxin wird ferner durch eine sehr stabile, enge Struktur gekennzeichnet, welche die Wirkungen auf Gesamtstrukturstabilität beeinflussen kann, welche durch Fusion des gewünschten Peptids oder Proteine verursacht wird.

[0033] Die dreidimensionale Struktur von E. coli Thioredoxin ist bekannt und enthält mehrere Oberflächen-Loops, einschließlich einem bezeichnenden Cys .... Cys Active-Site-Loop zwischen Resten Cys_{33} und Cys_{36}, welcher aus dem Körper des Proteins herausragt. Dieser Cys .... Cys Active-Site-Loop ist eine identifizierbare, zugängliche Oberflächen-Loop-Region und ist nicht in irgendwelche Interaktionen mit dem Rest des Proteins involviert, die zu Gesamtstrukturstabilität beitragen. Er ist daher ein guter Kandidat als Stelle für Peptidinsertionen. Sowohl die Amino-, als auch Carboxyl-Termini von E. coli Thioredoxin befinden sich an der Oberfläche des Proteins und sind für Fusionen leicht zugänglich. Humanes Thioredoxin, Glutaredoxin und weitere Thioredoxin-ähnliche Moleküle enthalten ebenfalls diesen Cys .... Cys Active-Site-Loop.

[0034] E. coli Thioredoxin ist ebenfalls gegenüber Proteasen stabil. So kann E. coli Thioredoxin zur Verwendung in E. coli Expressionssystemen wünschenswert sein, weil es als ein E. coli Protein durch Stabilität gegenüber E. coli Proteasen gekennzeichnet ist. E. coli Thioredoxin ist ebenfalls stabil gegenüber Erhitzen auf 80°C und niedrigem pH.

[0035] Weitere Thioredoxin-ähnliche Proteine, für welche durch Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenzen kodiert wird, welche in dieser Erfindung brauchbar sind, teilen homologe Aminosäuresequenzen und ähnliche physikalische und strukturelle Merkmale. So können DNA-Sequenzen, welche für weitere Thioredoxin-ähnli-

che Proteine kodieren, anstelle von E. coli Thioredoxin verwendet werden. Zum Beispiel ist die DNA-Sequenz, welche für andere Arten von Thioredoxin kodiert, z.B. humanes Thioredoxin, durch die Erfinder dieser Erfindung eingesetzt worden. Humanes Thioredoxin hat eine dreidimensionale Struktur, die auf die dreidimensionale Struktur von E. coli praktisch auflegbar ist, wie durch Vergleich der NMR-Strukturen der beiden Moleküle bestimmt. Humanes Thioredoxin enthält auch einen Active-Site-Loop, der mit dem Cys .... Cys Active-Site-Loop strukturell und funktionell äquivalent ist, welcher im E. coli Protein gefunden wird. Humanes IL-11, fusioniert im Rahmen an den Carboxyl-Terminus von humanem Thioredoxin (also eine humane Thioredoxin/IL-11 Fusion) wies die gleichen Expressionsmerkmale auf, wie die E. coli Thioredoxin/IL-11 Fusion, welche in Beispielen 1–2 beispielhaft dargestellt wird. Demzufolge ist humanes Thioredoxin ein Thioredoxin-ähnliches Molekül und kann anstelle oder zusätzlich zu E. coli Thioredoxin bei der Herstellung von Protein und kleinen Peptiden gemäß dem Verfahren dieser Erfindung verwendet werden. Insertionen in den humanen Thioredoxin Active-Site-Loop und an den Amino-Terminus können ebenso toleriert werden, wie jene in E. coli Thioredoxin.

[0036] Weitere Thioredoxin-ähnliche Sequenzen, welche in dieser Erfindung eingesetzt werden können, schließen alle oder Teile des Proteins Glutaredoxin und verschiedene Art-Homologe davon ein (A. Holingren, oben zitiert). Obwohl E. coli Glutaredoxin und E. coli Thioredoxin weniger als 20% Aminosäuren-Homologie teilen, haben die beiden Proteine konformative und funktionelle Ähnlichkeiten (Eklund et al., EMBO J. 3: 1443–1449 (1984)) und Glutaredoxin enthält einen Active-Site-Loop, der strukturell und funktionell mit dem Cys .... Cys Active-Site-Loop von E. coli Thioredoxin äquivalent ist. Glutaredoxin ist daher ein Thioredoxin-ähnliches Molekül, wie hierin definiert.

[0037] Die DNA-Sequenz, welche für Proteindisulfidisomerase (PDI) kodiert, oder der Teil davon, welcher die Thioredoxin-ähnliche Domäne enthält, und ihre Homologe der verschiedenen Arten (Edman et al., Nature 317: 267–270 (1985)) können ebenfalls als Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenz eingesetzt werden, da eine wiederholte Domäne von PDI > 30% Homologie mit E. coli Thioredoxin teilt und die wiederholte Domäne einen Acitve-Site-Loop enthält, der strukturell und funktionell mit dem Cys .... Cys Active-Site-Loop von E. coli Thioredoxin äquivalent ist. Diese drei Veröffentlichungen sehen Informationen bezüglich Glutaredoxin und PDI vor, welche bekannt und den Fachleuten verfügbar sind.

[0038] Ähnlich können die DNA-Sequenz, welche für Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) kodiert, Framente davon und Homologe verschiedener Arten davon (Bennett et al., Nature 334: 268–270 (1988)) ebenfalls in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, wie eine Thioredoxin-ähnliche Sequenz, basierend auf ihrer Aminosäurensequenz Homologie mit E. coli Thioredoxin, oder alternativ basierend auf Ähnlichkeiten in dreidimensionaler Konformation und der Gegenwart eines Active-Site-Loops, welcher strukturell und funktionell mit dem Cys .... Cys Active-Site-Loop von E. coli Thioredoxin äquivalent ist. Alles oder ein Teil der DNA-Sequenz, welche für ein Endoplasma-artiges Retikulum-Protein kodiert, wie Erp72, oder Homologe verschiedener Arten davon, werden ebenfalls als Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenzen für die Zwecke dieser Erfindung eingeschlossen (Mazzarella et al., J. Biol. Chem. 265: 1094–1101 (1990)), basierend auf Aminosäurensequenz Homologie oder alternativ basierend auf Ähnlichkeiten in dreidimensionaler Konformation und der Gegenwart eines Active-Site-Loops, welcher strukturell und funktionell mit dem Cys .... Cys Active-Site-Loop von E. coli Thioredoxin äquivalent ist. Eine weitere Thioredoxin-ähnliche Sequenz ist eine DNA-Sequenz, welche für das Ganze oder einen Teil eines adulten T-Zellen Leukämie-abgeleiteten Faktors (ADF) kodiert, oder Homologe weiterer Arten davon. N. Wakasugi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8282–8286 (1990). Von ADF wird nun angenommen, dass es humanes Thioredoxin ist. Ähnlich kann das Protein, welches zur Förderung von Disulfid-Bindungsbildung im Periplasma von E. coli verantwortlich ist, das Produkt des sdbA-Gens (Bardwell et al., Cell 67: 581–589 (1991) als Thioredoxin-ähnliche Sequenz angesehen werden. Diese vier Veröffentlichungen sehen Informationen über PI-PLC, ERp72, ADF und dsbA vor, welche den Fachleuten bekannt und verfügbar sind.

[0039] Es wird von der Definition von Thioredoxin-ähnlicher DNA-Sequenz, welche oben verwendet wird, erwartet, dass weitere Sequenzen, welche oben nicht speziell identifiziert werden, oder vielleicht noch nicht identifiziert oder veröffentlicht sind, Thioredoxin-ähnliche Sequenzen sein können, entweder basierend auf der 30% Aminosäurensequenz Homologie zu E. coli Thioredoxin, oder basierend auf dem Besitz von dreidimensionalen Strukturen, welche im Wesentlichen denen von E. coli oder humanem Thioredoxin ähnlich sind und einen Active-Site-Loop haben, welcher funktionell und strukturell mit dem des Cys .... Cys Active-Site-Loops von E. coli Thioredoxin äquivalent ist. Ein Fachmann kann bestimmen, ob ein Molekül diese letzteren beiden Kennzeichen hat, indem er seine dreidimensionale Struktur, wie zum Beispiel durch Röntgen-Kristallographie oder 2-dimensionale NMR-Spektroskopie analysiert, mit der veröffentlichten dreidimensionalen Struktur von E. coli Thioredoxin vergleicht, und durch Analysieren der Aminosäuresequenz des Moleküls, um zu bestimmen, ob es einen Active-Site-Loop enthält, der strukturell und funktionell mit dem Cys .... Cys Active-Site-Loop von E.

coli Thioredoxin äquivalent ist. Mit „im Wesentlichen ähnlich" in der dreidimensionalen Struktur oder Konformation ist gemeint, dass E. coli Thioredoxin so ähnlich wie Glutaredoxin ist. Zusätzlich ist ein vorhersehender Algorithmus beschrieben worden, welcher die Identifizierung von Thioredoxin-ähnlichen Proteinen durch Computer-gestützte Analyse von primärer Sequenz ermöglicht (Ellis et al., Biochemistry 31: 4882–91 (1992)). Basierend auf der obigen Beschreibung wird ein Fachmann in der Lage sein, Thioredoxin-ähnliche DNA-Sequenz zur Verwendung in dieser Erfindung ohne Anwendung von übermäßiger Experimentierung auszuwählen und zu identifizieren, oder falls gewünscht, zu modifizieren. Zum Beispiel sind Einzelpunkt-Mutationen, bestehend aus Teilen von nativem Thioredoxin oder nativen Thioredoxin-ähnlichen Sequenzen, welche die Struktur des sich ergebenden Moleküls nicht beeinflussen, alternative Thioredoxin-ähnliche Sequenzen, wie Allelen-Varianten von nativem Thioredoxin oder nativen Thioredoxin-ähnlichen Sequenzen.

[0040] DNA-Sequenzen, welche zur Sequenz für E. coli Thioredoxin oder seinen strukturellen Homologen unter entweder stringenten oder entspannten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren, kodieren ebenfalls für Thioredoxin-ähnliche Proteine zur Verwendung in dieser Erfindung. Ein Beispiel für eine solche stringente Hybridisierungsbedingung ist Hybridisierung bei 4 × SSC bei 65°C, gefolgt von Waschen in 0,1 × SSC bei 65°C für eine Stunde. Alternativ ist eine exemplarische stringente Hybridisierungsbedingung in 50% Formamid, 4 × SSC bei 42°C. Beispiele für nicht stringente Hybridisierungsbedingungen sind 4 × SSC bei 50°C oder Hybridisierung mit 30–40% Formamid bei 42°C. von der Verwendung von all solchen Thioredoxin-ähnlichen Sequenzen wird angenommen, dass sie in dieser Erfindung eingeschlossen sind.

[0041] Konstruktion einer Fusionssequenz, welche für ein Fusionsprotein zur Verwendung in einem Verfahren der vorliegenden Erfindung kodiert, welches die DNA-Sequenz eines ausgewählten Peptids oder Proteins und die DNA-Sequenz einer Thioredoxin-ähnlichen Sequenz umfasst, setzt konventionelle Gentechniken ein, siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989). Fusionssequenzen können auf viele unterschiedliche Weisen hergestellt werden. Zum Beispiel kann das gewählte heterologe Protein an den Amino-Terminus des Thioredoxin-ähnlichen Moleküls fusioniert werden. Alternativ kann die gewählte Proteinsequenz an den Carboxyl-Terminus des Thioredoxin-ähnlichen Moleküls fusioniert werden. Kleine Peptidsequenzen könnten ebenfalls an eine der oben erwähnten Positionen der Thioredoxin-ähnlichen Sequenz fusioniert werden, um sie auf eine strukturell zwanglose Weise herzustellen.

[0042] Diese Fusion eines gewünschten heterologen Peptids oder Proteins an das Thioredoxin-ähnliche Protein erhöht die Stabilität des Peptids oder Proteins. An entweder den Amino- oder Carboxyl-Terminus wird das gewünschte heterologe Peptid oder Protein auf solch eine Weise fusioniert, dass die Fusion nicht die native Struktur eines der Proteine destabilisiert. Zusätzlich verbessert Fission des löslichen Thioredoxin-ähnlichen Proteins die Löslichkeit des gewählten heterologen Peptids oder Proteins.

[0043] Es kann für eine Vielfalt an Gründen bevorzugt werden, dass Peptide innerhalb des Active-Site-Loops des Thioredoxin-ähnlichen Moleküls fusioniert werden. Die Region an der Oberfläche von Thioredoxin, welche den Active-Side-Loop umgibt, hat sich bei Halten an die Hauptfunktion des Proteins als nichtspezifische Protein-Disulfidoxid-Reduktase so entwickelt, dass sie in der Lage ist, mit einer großen Vielfalt an anderen Proteinoberflächen zu interagieren, und kann so gegenüber der Gegenwart von insertierten Sequenzen besonders tolerant sein. Zusätzlich wird die Active-Site-Loop Region durch Segmente von starker sekundärer Struktur gebunden, was viele Vorteile für Peptidfusionen vorsieht. Jedes kleine Peptid, welches in den Active-Site-Loop eines Thioredoxin-ähnlichen Proteins insertiert wird, ist in einer Region des Proteins vorhanden, welche nicht in das Aufrechterhalten von tertiärer Struktur einbezogen ist. Daher ist die Struktur solch eines Fusionsproteins stabil. Tatsächlich hat vorhergehende Arbeit gezeigt, dass E. coli Thioredoxin in zwei Fragmente an einer Position gespalten werden kann, welche sich nahe dem Active-Site-Loop befindet, und die tertiären Interaktionen, welche das Protein stabilisieren, dennoch intakt bleiben.

[0044] Der Active-Site-Loop von E. coli Thioredoxin hat die Sequenz NH_2 ... Cys_{33}-Gly-Pro-Cys_{36} ... COOH. Fusionieren eines gewählten Peptids mit einem Thioredoxin-ähnlichen Protein in dem Active-Site-Loop Teil des Proteins schränkt das Peptid an beiden Enden ein, was den Grad der konformativen Freiheit des Peptids verringert und demzufolge die Anzahl an möglichen alternativen Strukturen verringert, welche durch das Peptid angenommen werden können. Das insertierte Peptid wird an jedem Ende durch Cysteinreste gebunden, welche eine Disulfid-Bindung zueinander bilden können, wie es in nativem Thioredoxin passiert, und die konformative Freiheit des insertierten Proteins weiter begrenzen.

[0045] Zusätzlich schützt die Fusion eines Peptids in den Loop dieses vor den Wirkungen von E. coli Amino- und Carboxyl-Peptidasen. Ferner besteht eine Restriktions-Endonuklease-Spaltungsstelle RsrII bereits in dem

Teil der E. coli Thioredoxin DNA-Sequenz, welche für die Loop-Region kodiert, an genau der richtigen Stelle für eine Peptid-Genfusion (siehe McCoy et al. supra; **Fig.** 4). RsrII erkennt die DNA-Sequenz CGG(A/T)CCG, welche ein drei Nukleotid langes 5'-herausragendes klebriges Ende hinterlässt. DNA, welche das komplementäre klebrige Ende trägt, wird daher an dieser Stelle in nur einer Ausrichtung insertieren.

[0046] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Fusionsprotein" jedes „Protein von Interesse" ein, dass kovalent an ein anderes Protein, z.B. den Fusionspartner, gebunden ist, aber ist nicht darauf beschränkt. Die Spaltung von Produkten des Fusionsproteins umfasst den Fusionspartner und das Protein von Interesse. Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Thioredoxin-Fusionsprotein" das Expressionsprodukt der Thioredoxin-ähnlichen DNA (supra beschrieben) und weitere DNA ein, welche für das Protein von Interesse kodiert, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0047] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Anionen-Austauschharz" jede Art von Träger ein, an welchen positiv geladene Pendant-Gruppen gebunden werden, wie Diethylaminoethan (DEAE), Polyethylenimin (PEI) oder quaternäre Aminoethan (QAE) Gruppen, ist aber nicht darauf beschränkt. Die Gruppen können entweder ungeachtet des pH positiv geladen sein, oder innerhalb einer bestimmten pH-Bandbreite positiv geladen sein und außerhalb dieser pH-Bandbreite neutral (ohne Ladung) sein.

[0048] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Kationen-Austauschharz" jede Art von Träger ein, an welchen negativ geladene Pendant-Gruppen gebunden werden, wie Sulfonyl, Sulfylpropyl (SP), Carboxyl oder Carboxymethyl (CM) Gruppen, ist aber nicht darauf beschränkt. Die Gruppen können entweder ungeachtet des pH negativ geladen sein, oder innerhalb einer bestimmten pH-Bandbreite negativ geladen sein und außerhalb dieser pH-Bandbreite neutral (ohne Ladung) sein.

[0049] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „geladen" eine chemische Art mit einer elektrostatischen Netto-Ladung ein, die nicht Null ist, entweder positiv oder negativ, ungeachtet der Höhe dieser Netto-Ladung, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0050] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „negativ geladen" jede chemische Art ein, geladen oder nicht, die an ein Anionen-Austausch-Chromatographie-Harz bei dem pH und der ionischen Stärke des Arbeitspuffers adsorbiert, oder jede chemische Art, die nicht an ein Kationen-Austausch-Chromatographie-Harz bei dem pH und der ionischen Stärke des Arbeitspuffers adsorbiert, aber ist nicht darauf beschränkt.

[0051] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „positiv geladen" jede chemische Art ein, geladen oder nicht, die an ein Kationen-Austausch-Chromatographie-Harz bei dem pH und der ionischen Stärke des Arbeitspuffers adsorbiert, oder jede chemische Art, die nicht an ein Anionen-Austausch-Chromatographie-Harz bei dem pH und der ionischen Stärke des Arbeitspuffers adsorbiert, aber ist nicht darauf beschränkt.

[0052] Wie detaillierter unten beschrieben, schließt der Begriff „Wirtszelle" im Allgemeinen jeden transformierten oder nicht-transformierten gram negativen Mikroorganismus ein.

[0053] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Chelator" jede Verbindung ein, welche zwei oder mehr intermolekulare gewöhnliche oder Coordinat-Bindungen mit Metallionen in Lösung bilden wird, so dass einer oder mehrere heterocyclische Ringe mit jedem gebundenen Metall-Ion gebildet werden, aber ist nicht darauf beschränkt, und schließt solche Verbindungen wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Diethylentriaminopentaessigsäure (DPTA), Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)tetraessigsäure (EGTA), 1,2-Cyclohexandiamintetraessigsäure (CDTA) und Zitronensäure ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0054] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „zweiwertiges Kation" solche Arten wie Mg^{++} (Magnesium), Mn^{++} (Mangan), Ca^{++} (Calcium) und ähnliche ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0055] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff „Sammeln" zum Beispiel das Verfahren ein, durch welches ein Verfahrensstrom durch eine Säule aus Chromatographieharz gepumpt wird, und die nicht gebundene Fraktion (manchmal als die Durchflussfraktionen bezeichnet) gesammelt wird, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0056] Während das vorliegende Verfahren der Erfindung durch Reinigung von rekombinant-hergestellten Proteinen aus transformierten Wirtszellen beispielhaft dargestellt wird, ist das Verfahren ebenfalls offen für Reinigung von Proteinen, welche natürlich innerhalb einer Zelle vorkommen und kann allgemein verwendet werden, um Proteine ungeachtet der Quelle aus jeder Lösung zu reinigen.

[0057] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Praxis der Erfindung. Diese Beispiele dienen nur veranschaulichenden Zwecken und sind in keinster Weise so beabsichtigt, dass sie den Umfang der beanspruchten Erfindung einschränken. Beispiel 1 beschreibt die Konstruktion eines Fusionsproteins; Beispiel 2 beschreibt die Expression eines Fusionsproteins; Beispiel 3 beschreibt die selektive Freisetzung von Protein aus einer Zelle unter Verwendung von Chelator; Beispiel 4 betrifft die Entfernung der negativ geladenen Moleküle aus Lösung; Beispiel 5 beschreibt die selektive Ausfällung mit Zink; und Beispiel 6 betrifft die Reinigung eines Fusionsproteins, basierend auf einem Unterschied im pI nach Abspaltung des Proteins von Interesse von seinem Fusionspartner.

Beispiel 1 – Herstellung von Fusionsprotein-Molekül

[0058] Ein Thioredoxin-ähnliches Fusionsprotein kann durch Konstruieren einer Fusions-DNA, welche eine Thioredoxin-ähnliche Sequenz, gebunden an eine DNA umfasst, welche für das Polypeptid von Interesse kodiert, und Exprimieren des DNA-Konstrukts in einer passenden Wirtszelle hergestellt werden. Zum Beispiel kann ein Thioredoxin-ähnliches Fusionsmolekül der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von E. coli Thioredoxin als Thioredoxin-ähnliche Sequenz und rekombinantem IL-11 (Paul et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7512–7516 (1990), siehe auch gleichzeitig anhängige US-Patentanmeldungen SN-07/526474 und SN-07/441100 und PCT-Patentveröffentlichung WO 91/07495, veröffentlicht am 30. Mai 1991) als gewähltes heterologes Protein hergestellt werden. Das E. coli Thioredoxin (trxA)-Gen (McCoy et al., supra) wurde basierend auf seiner veröffentlichten Sequenz kloniert und eingesetzt, um verschiedene verwandte E. coli Expressionsplasmide unter Verwendung von Standardtechniken der DNA-Manipulation zu konstruieren, ausführlich beschrieben durch Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0059] Ein erstes Expressionsplasmid pALtrxA-781 wurde konstruiert, welches das E. coli trxA-Gen ohne Fusion an eine weitere Sequenz enthält. Dieses Plasmid enthielt ferner Sequenzen, welche detailliert unten für das verwandte IL-11 Fusionsplasmid beschrieben werden. Dieses erste Plasmid, welches die Akkumulierung von > 10% des gesamten Zellproteins als Thioredoxin in einem E. coli Wirtsstamm G1724 steuert, wurde wie unten für die Konstruktion von trxA/IL-11 Fusionssequenz weiter manipuliert.

[0060] Alternativ wurde ein Thioredoxin-ähnliches Molekül, welches modifiziert wurde, um Metall-bindende/Chelat-bildende Aminosäurereste einzuschließen, wie z.B. Histidinreste an Positionen 2, 31 und 63 oder alternativ an Positionen 31 und 63, wie in gleichzeitig anhängiger USSN 08/165301 beschrieben, unter Verwendung von Standardtechniken der DNA-Manipulation (Verweis oben) hergestellt.

[0061] Die gesamte Sequenz des verwandten Plasmid-Expressionsvektors pALtrxA/EK/IL11$_{\Delta}$Pro-581 (McCoy et al., supra, wie in **Fig.** 1 veranschaulicht) enthält die folgenden Hauptmerkmale:
Nukleotide 1–2060 enthalten DNA-Sequenzen, welche von dem Plasmid pUC-18 stammen (Norrander et al., Gene 26: 101–106 (1983)), einschließlich Sequenzen, welche das Gen für β-Lactamase enthalten, welches Resistenz gegenüber antibiotischem Ampicillin in E. coli Wirtsstämmen verleiht, und einem colE1-abgeleiteten Replikationsursprung. Nukleotide 2061–2221 enthalten DNA-Sequenzen für den linksgerichteten Hauptpromoter (pL) von Bakteriophage λ (Sanger et al., J. Mol, Biol. 162: 729–773 (1982)), einschließlich drei Operatorsequenzen O_L1, O_L2 und O_L3. Die Operatoren sind die Bindungsstellen für λcl Repressorprotein, deren intrazelluläre Gehalte die Menge an Transkriptionsinitiation von pL kontrollieren. Nukleotide 2222–2241 enthalten eine starke Ribosom-bindende Sequenz, abgeleitet von der von Gen 10 von Bakteriophage T7 (Dunn und Strudier, J. Mol. Biol. 166: 477–535 (1983)).

[0062] Nukleotide 2242–2568 enthalten eine DNA-Sequenz, welche für das E. coli Thioredoxin-Protein kodiert (Lim et al., J. Bacteriol. 163: 311–316 (1985)). Es gibt kein Tanslations-End-Codon am Ende der Thioredoxin-Kodierungssequenz in diesem Plasmid.

[0063] Nukleotide 2569–2583 enthalten DNA-Sequenz, welche für die Aminosäuresequenz für ein kurzes, hydrophiles, flexibles Spacer-Peptid „--GSGSG--" kodiert. Nukleotide 2584–2598 sehen DNA-Sequenz vor, welche für die Aminosäuresequenz für die Spaltungserkennungsstelle von Enterokinase kodiert (EC 3.4.4.8), „--DDDDK--" (Maroux et al., J. Biol. Chem. 246: 5031–5039 (1971)) kodiert.

[0064] Als alternative Ausführungsform kann ein einzelner zusätzlicher Codon in die Linker-Sequenz des Plasmids insertiert werden, um eine spezifische Stelle für chemische Spaltung des Thioredoxin-IL-11 Fusionsproteins durch Hydroxylamin einzuführen. Das zwischen Resten 2598 und 2599 von pALtrxA/EK/Il11$_{\Delta}$Pro-581 eingeführte Nukleotid-Triplett „-AAT-" kodiert für einen Asparaginrest. Dieses Asparagin umfasst in Verbindung

mit dem direkt folgenden Glycinrest eine neue Hydroxylamin-Spaltungsstelle. Unter passenden Bedingungen, welche in Beispiel 6 detailliert ausgeführt werden, wird Hydroxylaminspaltung zwischen den Asparagin- und Glycinresten auftreten. Als zusätzliches Merkmal dieser alternativen Ausführungsform können zwei natürlich auftretende Asparaginreste, welche beim Wild-Typ Thioredoxin vorhanden sind, Aminosäuren 84 und 107, durch Standardtechniken zu Glutamin umgewandelt werden, um zwei weitere unerwünschte Hydroxylamin-Spaltungsstellen zu entfernen und dadurch sekundäre Hydroxylamin-Spaltungsprodukte zu verringern, welche nachfolgende Reinigungsverfahren behindern könnten.

[0065] Nukleotide 2599–3132 enthalten DNA-Sequenz, welche für die Aminosäuresequenz einer modifizierten Form von reifem, humanen IL-11 kodiert (Paul et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7512–7516 (1990)), deletiert um den N-terminalen Prolylrest, welcher normalerweise im natürlichen Protein gefunden wird. Die Sequenz schließt ein Translations-End-Codon am 3'-Ende der IL-11 Sequenz ein.

[0066] Nukleotide 3133–3159 sehen eine „Linker"-DNA-Sequenz vor, welche Restriktionsendonukleasestellen enthält. Nukleotide 3160–3232 sehen eine Transkriptions-Endsequenz vor, welche auf der des E. coli aspA-Gens basiert (Takagi et al., Nucl. Acids Res. 13: 2063–2074 (1985)). Nukleotide 3233–3632 sind DNA-Sequenzen, abgeleitet von pUC-18.

[0067] Wie in Beispiel 2 unten beschrieben, kann dieser Plasmid-Vektor, wenn er unter den passenden Bedingungen in geeignetem E. coli Wirtsstamm kultiviert wird, die Herstellung von hohen Graden (annähernd 10% des gesamten zellulären Proteins) eines Thioredoxin/IL-11 Fusionsproteins steuern. Wenn es nicht an Thioredoxin fusioniert ist, akkumuliert IL-11 im Gegensatz dazu nur 0,2% des gesamten zellulären Proteins, wenn es in einem analogen Wirt/Vektorsystem exprimiert wird.

Beispiel 2 – Expression eines Fusionsproteins

[0068] Ein Thioredoxin/IL-11 Fusionsprotein wird gemäß dem folgenden Protokoll unter Verwendung des wie in Beispiel 1 beschrieben konstruierten Plasmids hergestellt. pALtryA/EK/IL11$_{\Delta}$Pro-581 wird durch das Verfahren von Dagert und Ehrlich, Gene 6: 23 (1979), in den E. coli Wirtsstamm GI724 (F^-, $lacI^q$, $lacP^{L8}$, ampC::λcI^+) umgewandelt. Der nicht umgewandelte Wirtsstamm E. coli GI724 wurde bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland am 31. Januar 1991 unter ATCC Nr. 55151 für Patentzwecke entsprechend anwendbaren Gesetzen und Bestimmungen hinterlegt. Transformanten werden an 1,5% Gew./Vol. Agar-Platten selektiert, welche IMC-Medium enthalten, welches aus M9-Medium besteht (Miller, „Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)), welches 1 mM $MgSO_4$ enthält, ergänzt durch 0,5% Gew./Vol. Glucose, 0,2% Gew./Vol. Casaminosäuren und 100 µg/ml Ampicillin.

[0069] GI724 enthält eine Kopie des Wild-Typ λcI-Repressorgens, welche in das Chromosom am ampC-Ort stabil integriert ist, wo es unter die transkriptionale Kontrolle von Salmonella typhimurium trp Promotor/Operator-Sequenzen gestellt worden ist. In GI724 wird λcI-Protein nur während des Wachstums in Tryptophan-freien Medien hergestellt, wie minimalen Medien oder einem minimalen Medium, ergänzt durch Casaminosäuren wie IMC, wie oben beschrieben. Zugabe von Tryptophan zu einer Kultur von GI724 wird den trp-Promotor unterdrücken und Synthese von λcI-Protein abschalten, was allmählich die Herbeiführung von Transkription von pL-Promotoren verursacht, falls sie in der Zelle vorhanden sind.

[0070] Mit pALtrxA/EK/IL11 Pro-581 umgewandeltes GI724 wird bei 30°C zu einem A_{600} von 20 in IMC-Medium (mit 3 × $MgSO_4$) gezogen. Die Glukosekonzentration der Kultur wird bei annähernd 0,2% (Gew./Vol.) gehalten. Der pH wird bei 7,0 mit 7,5 M Ammoniumhydroxid gehalten. Tryptophan wird zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und die Kultur wird für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit akkumulierte Thioredoxin/IL-11 Fusionsprotein zu annähernd 10% des gesamten Zellproteins.

[0071] Vom gesamten Fusionsprotein wird gefunden, dass es sich in der löslichen zellulären Fraktion befindet und wird wie folgt für die folgenden Analysen gereinigt. Zellen werden in einer French-Druckzelle bei 20000 psi in 50 mM HEPES, pH 8,0, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid lysiert. Das Lysat wird durch Zentrifugation bei 15000 × g für 30 Minuten zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand wird auf eine QAE-Toyopearl Säule geladen. Die Durchflussfraktionen werden verworfen und das Fusionsprotein wird mit 50 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl eluiert. Das Eluat wird zu 2 M NaCl angepasst und auf eine Säule aus Phenyl-Toyopearl geladen. Die Durchflussfraktionen werden wieder verworfen und das Fusionsprotein wird mit 50 mM HEPES, pH 8,0, 0,5 M NaCl eluiert.

[0072] Das Fusionsprotein wird dann gegen 25 mM HEPES, pH 8,0 dialysiert und ist in diesem Stadium >

80% rein. Durch T1165 Biotest (Paul et al., supra) weist das gereinigte Thioredoxin/IL-11 Protein eine Wirksamkeit von 8×10^6 U/mg auf. Dieser Wert stimmt eng auf molarer Basis mit der Wirksamkeit von 2×10^6 U/mg überein, welcher für COS Zell-abgeleitete IL-11 im gleichen Test gefunden wird. Ein Milligramm des Fusionsproteins wird bei 37°C für 20 Stunden mit 1000 Einheiten von boviner Enterokinase (Leipnieks et al., J. Biol. Chem. 254: 1677–1683 (1979)) in 1 ml 10 mM Tris-Cl (pH 8,0)/10 mM $CaCl_2$ gespalten. IL-11 wird durch Passieren über eine QAE-Toyopearl-Säule in 25 mM HEPES, pH 8,0 aus den Umsetzungsprodukten gewonnen, wobei IL-11 in den Durchflussfraktionen gefunden wird. Nicht gespaltenes Fusionsprotein, Thioredoxin und Enterokinase verbleiben an die Säule gebunden. Das auf diese Weise hergestellte IL-11 hat eine biologische Wirksamkeit im T1165-Test von $2{,}5 \times 10^6$ U/mg. Seine physikalischen und chemischen Eigenschaften werden wie folgt bestimmt:

(1) Molekulargewicht

[0073] Es wurde gefunden, dass das Molekulargewicht von IL-11 etwa 21 kD beträgt, wie durch 10% SDS-PAGE unter Reduzierungsbedingungen (Tricin-System) gemäß den Verfahren von Schagger et al., Anal. Biochem. 166: 368–379 (1987) berechnet. Das Protein lief als einzelnes Band.

(2) Endotoxingehalt

[0074] Vom Endotoxingehalt des IL-11 wurde gefunden, dass er im LAL (Limulus Amebozyten-Lysat, Pyrotel, erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts, USA) Test, durchgeführt gemäß den Anweisungen des Herstellers, weniger als 0,1 Nanogramm pro Milligramm IL-11 beträgt.

(3) Isoelektrischer Punkt

[0075] Der theoretische isoelektrische Punkt von IL-11 ist pH 11,70. Wie durch Polyacrylamid-Gel isoelektrischem Fokussieren unter Verwendung einer LKB Ampholin PAGplate mit einem pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 gemessen, beläuft sich das IL-11 auf mehr als 9,5. Eine genaue Messung kann nicht unternommen werden, weil IL-11 ein zu basisches Protein für genaue pI-Bestimmung ist.

(4) Fluoreszenz-Absorptionsspektrum

[0076] Das Fluoreszenz-Absorptionsspektrum von IL-11, wie an einer 0,1% wässerigen Lösung in einer 1 cm Quartz-Zelle gemessen, zeigt ein Emissionsmaximum bei 335–337 nm.

(5) UV-Absorption

[0077] UV-Absorption des IL-11 an einer 0,1% wässerigen Lösung in einer 1 cm Quartz-Zelle zeigte ein Extinktionsmaximum bei 278–280 nm.

(6) Aminosäure-Zusammensetzung

[0078] Die theoretische Aminosäure-Zusammensetzung für IL-11, basierend auf seiner Aminosäuresequenz, ist wie folgt:

Aminosäure	Zahl	Mol-%
Ala	20	11,3
Asp-Säure	11	6,22
Cystein	0	0
Glu	3	1,70
Phe	1	0,57
Gly	14	7,91
His	4	2,26
Ile	2	1,13
Lys	3	1,70
Leu	41	23,16
Met	2	1,13
Asn	1	0,57
Pro	21	11,86
Gln	7	3,96
Arg	18	10,17
Ser	11	6,22
Thr	9	5,09
Val	5	2,83
Trp	3	1,7
Tyr	1	0,57

[0079] Eine Probe von homogenem IL-11 wird Dampfphasen-Hydrolyse wie folgt unterworfen: 6 N HCl und 2 N Phenol-Reagens wurden zu einem Hydrolysegefäß zugegeben, in welches Röhren, welche 45 µl von 1:10 verdünntem (Gew./H_2O) IL-11 enthalten, konzentriert zu Trockenheit, insertiert werden. Die Proben werden unter Vakuum versiegelt und für 36 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse werden die Proben getrocknet und in 500 µl Na-S Probenverdünnungspuffer resuspendiert. Aminosäureanalyse wurde an einem Beckman 7300 automatisierten Aminosäure-Analysator durchgeführt. Eine Kation-Austauschsäule wird zur Trennung von Aminosäuren nach Post-Säulen-Derivatisierung mit Ninhydrin verwendet. Primäre Aminosäuren werden bei 570 nm nachgewiesen und sekundäre Aminosäuren werden bei 440 nm nachgewiesen. Acht-Punkt Kalibrierungskurven werden für jede der Aminosäuren konstruiert.

[0080] Weil bestimmte Aminosäuren typischerweise nicht gewonnen werden, werden die Ergebnisse für nur 5 Aminosäuren unten angegeben. Da die Hydrolyse ohne Entsalzen des Proteins durchgeführt wird, wurde 100 Gewinnung für das meiste der Aminosäuren erreicht.

[0081] Die relative Gewinnung von jedem einzelnen Aminosäurerest pro Molekül an rekombinantem IL-11 wird durch Normalisieren von GLX = 10 bestimmt (der vorhergesehenen Anzahl an Glutamin und Glutaminsäurerest in IL-11, basierend auf cDNA-Sequenz). Der für die Gewinnung von GLX erhaltene Wert in Picomol wird durch 10 geteilt, um den GLX-Quotienten zu erhalten. Teile des erhaltenen Werts für die Gewinnung in Picomol von jeder Aminosäure durch den GLX-Quotienten für die Probe ergibt eine Zahl, welche die relative Gewinnung von jeder Aminosäure in der Probe ergibt, normalisiert zur quantitativen Gewinnung von GLX-Resten. Der Korrelationskoeffizient, welcher die erwartete gegenüber der durchschnittlichen Anzahl an beobachteten Resten von jeder Aminosäure vergleicht, ist größer als 0,985, was anzeigt, dass die Anzahl an Resten, die für jede Aminosäure beobachtet wird, in guter Übereinstimmung mit der vorhergesehenen Sequenz ist.

Aminosäuren	Anz. an errechneten Resten	Anz. an erwarteten Resten	Korrelationskoeffizient
1 Asp	12,78	12	
2 Glu	10,00	10	
3 Gly	12,80	14	0,9852
4 Arg	16,10	18	
5 Pro	18,40	21	

(7) Amino-Terminus Sequenzieren

[0082] IL-11 (gepuffert in 95% Acetonitril TFA) wird unter Verwendung eines ABI 471A Proteinsequenzierers (ABI, Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellers sequenziert. Amino-Terminus Sequenzierung bestätigt, dass das Thioredoxin-Fusionsprotein erzeugte IL-11 die korrekte IL-11 Aminosäuresequenz enthält und nur ein Amino-Terminus beobachtet wird.

(8) Peptid-Kartierung

[0083] Das IL-11 wird mit Endoproteinase Asp-N (Boehringer Mannheim) (1:500 Verhältnis von Asp-N zu IL-11) in 10 mM Tris, pH 8, 1M Harnstoff und 2 mM 4-Aminobenzamidin-dihydrochlorid (PABA) bei 37°C für 4 Stunden gespalten. Die Probe wird dann an HPLC an einer C4 Vydac Säule unter Verwendung eines A-Puffers von 50 mM $NaHPO_4$, pH 4,3, in dH_2O, eines B-Puffers von 100 Isopropanol mit einem Gradienten bei 1 ml/Min. von 100% A zu 25% A und 75% B (wechselnd bei 1%/Minute) laufen gelassen. Die eluierten Peptid-Fragmente werden dann unter Verwendung eines ABI 471A Proteinsequenzierers (ABI, Inc.) gemäß den Anweisungen des Herstellers sequenziert. Die Peptidkarte bestätigte, dass das aus dem Thioredoxin-Fusionsprotein hergestellte IL-11 die erwarteten IL-11 N-terminalen und C-terminalen Sequenzen enthält.

(9) Löslichkeit

[0084] Il-11 Protein wird bezüglich seiner Löslichkeit in den Substanzen unten mit den folgenden Ergebnissen getestet:

Wasser	sehr löslich
Ethylalkohol	sehr löslich
Aceton	sehr löslich
1 M Natriumchlorid	sehr löslich
10% Sucrose	sehr löslich

(10) Zuckerzusammensetzung und Protein/Polysaccharidgehalt in %

[0085] Die Abwesenheit von Zuckerbestandteilen, gebunden an die Polypeptid-Hauptkette des IL-11 Proteins, wird durch seine Aminosäuresequenz angezeigt, welche keine der typischen Zucker-Bindungsstellen enthält.

[0086] Wenn das Fusionskonstrukt so hergestellt wird, dass es eine Hydroxylamin-Spaltungsstelle hat, wird Spaltung wie folgt durchgeführt. Ein Thioredoxin/IL-11 Fusionsprotein, modifiziert wie oben beschrieben, um eine Hydroxylamin-Spaltungsstelle zwischen den Thioredoxin und IL-11 Sequenzen zu enthalten, wird in einer Umsetzung mit Hydroxylamin chemisch gespalten. Das modifizierte Fusionsprotein bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml wird in einer Umsetzung mit 1M Hydroxylamin in 0,1 M CHES-Puffer bei pH 9,7 gespalten. Die Umsetzung darf für 11 Std. bei 35°C fortschreiten und wird durch Kühlen auf 4°C und Senken des pH auf pH 8,0 durch die Zugabe von Tris-HCl (pH 7,3) beendet.

Beispiel 3 – Selektive Proteinfreisetzung

[0087] Die selektive Freisetzung eines Fusionsproteins aus dem Zytoplasma von intakten, geernteten E. coli Zellen findet als Folge von Destabilisierung der äußeren Zellmembran durch einen Chelator wie TRIS/EDTR statt. Vom Chelatbildner EDTA wird angenommen, dass er gram-negative Bakterien durch Binden zweiwertiger Kationen, die Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Membran stabilisieren, durchlässig macht. Während in einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform die Zellen vor dem Freisetzungsschritt zuerst geerntet wer-

den, ist es ebenfalls möglich, Chelator einfach direkt zum Zellkulturmedium zuzugeben. Ein Überschuss an Chelator wird zugegeben um sicherzustellen, dass der Vorrat an Chelator nicht durch irgendwelche Einheiten erschöpft wird, die in dem Kulturmedium vorhanden sind, welche durch Chelator gebunden werden.

[0088] Selektive Freisetzung wird zum Beispiel durch Zugeben einer Lösung aus 680 mM TRIS, 240 mM EDTA, pH 8,0 zum Ernte/Freisetzungsgefäß erreicht, welches gekühlte (3°C) geerntete Zellen enthält. Die Puffer-Endzusammensetzung ist 50 mM Tris und 15 mM EDTA und die E. coli Konzentration in der sich ergebenden Suspension beträgt 250 Gramm (Nasszellengewicht) pro Liter. Die Suspension wird auf 37°C erhitzt und für 30 Minuten inkubiert. Base, wie 5 N NaOH wird verwendet, um den pH der Freisetzungssuspension auf etwa pH 8,5 anzupassen. Diese Behandlung setzt Fusionsprotein und ein Spektrum an konstitutiven E. coli Proteinen frei. Etwa 50% des gesamten Zellproteins einschließlich mehr als 80% des Proteins von Interesse und 15% zelluläre DNA werden freigesetzt. Die Menge an Protein, welche aus den Zellen nach Zugabe der TRIS/EDTA Lösung zur Suspension aus geernteten Zellen freigesetzt wird, wird durch einen Bradford-Test überwacht (Bradford, M., Analytical Biochemistry 72: 248–254 (1976)).

[0089] Tabelle 2 führt die kontrollierten Arbeitsparameter für diesen Freisetzungsschritt auf, einschließlich bevorzugter Ziele, als auch bevorzugter Bandbreiten. Ein Fachmann wird anerkennen, dass weitere Bandbreiten ähnlich effektiv sein werden. Tabelle 3 führt die überwachten Arbeitsparameter auf.

Tabelle 2

Freisetzungsschritt: kontrollierte Arbeitsparameter

Parameter	Bevorzugtes Ziel	Bevorzugte Bandbreite
Freisetzungsgefäß Temperatur	37°C	32-42°C
Freisetzungsgefäß Bewegung	170 U/Min.	160-180
Freisetzungsgefäß pH	8,5	8,0-8,8 pH
Freisetzungszeit	30 Min.	20-60 Min.

Tabelle 3

Freisetzungsschritt: Überwachte Arbeitsparameter

Parameter	Bevorzugtes Ziel
Gesamtes freigesetztes Protein (Bradford bei 30 Min.)	12 mg/ml
Gesamtprotein bezogen auf Lyse	50%
Gesamte freigesetzte DNA	300 ug/ml
Gesamt-DNA bezogen auf Lyse	15%

[0090] Das Freisetzungsverfahren setzt ebenfalls polyanionische Arten aus den Zellen frei wie DNA, RNA und LPS. Das Vorkommen dieser nicht-proteinhaltigen Bestandteile in der Freisetzungssuspension macht sie trübe und relativ unfiltrierbar. Sie werden durch den Klärungsschritt wie in Beispiel 4 beschrieben entfernt.

Beispiel 4 – Klärung und Entfernung von negativ geladenen Molekülen

[0091] Verfahrensmaterial wird durch selektive Ausfällung von nicht-proteinhaltigen Bestandteilen geklärt und ergibt einen filtrierbaren Verfahrensstrom. Ausfällung wird durch aufeinander folgende Zugabe von 2 M $MgCl_2$, 95% Ethanol und 2 M $CaCl_2$ zum Ernte/Freisetzungsgefäß begonnen, welches die Freisetzungssuspension enthält. Die Konzentration von Reaktanten in der sich ergebenden Suspension beträgt 125 mM $MgCl_2$, 75 mM $CaCl_2$ und 14% (Volumen/Volumen-%) Ethanol. Die Ausfällung, welche für minimal fünf Minuten ausgeführt wird, wird bei 32°C und einem pH von 7,5 kontrolliert. Die Konzentration von Reaktanten und der pH, die Temperatur und Umsetzungszeit werden innerhalb der in Tabelle 4 gezeigten Grenzen kontrolliert. Nicht-proteinhaltige Bestandteile werden durch fortlaufende Zentrifugation bei einer maximalen zentrifugalen Kraft von 15000 × g, einer Verweilzeit von 1,4 Minuten und einer Sedimentationsentfernung von 0,5 mm aus der Sus-

pension entfernt. Falls gewünscht können rückständige Feststoffteilchen durch 0,5 µm In-line Filtration aus dem Flüssigkeitsüberstandstrom entfernt werden. Mehr als 80% der DNA und 90% der LPS in vorheriger Lösung werden entfernt. Gewinn des Proteins von Interesse beträgt circa 80%. Die Proteinkonzentration (Bradford-Test) und Trübung (OD_{600}) werden als Indikatoren von Verfahrensleistung überwacht.

[0092] Tabelle 4 führt die kontrollierten Arbeitsparameter für diesen Klärungsschritt einschließlich bevorzugter Ziele, als auch bevorzugte Bandbreiten auf. Ein Fachmann kann leicht erkennen, dass weitere Bandbreiten ähnlich effektiv sein werden. Tabelle 5 führt Leistungsmerkmale von überwachten Parametern auf.

Tabelle 4

Klärungsschritt: Kontroll-Arbeitsparameter

Parameter	Bevorzugtes Ziel	Bevorzugte Bandbreite
2M $MgCl_2$	0,083 (Vol./Vol.)[a]	0,066-0,10 (Vol./Vol.)[a]
2M $CaCl_2$	0,050 (Vol./Vol.)[a]	0,033-0,068 (Vol./Vol.)[a]
95% Ethanol	0,20 (Vol./Vol.)[a]	0,17-0,23 (Vol./Vol.)[a]
Klärungsgefäß/Temperatur	32°C	20-37°C
Klärungsgefäß/Bewegung	220 U/Min.	210-230 U/Min.
Klärungsgefäß/pH	7,5	6,8-7,8
Klärungszeit	5 Min.	5-30 Min.

[(a)] Volumen Reagens/Volumen Freisetzungssuspension

Tabelle 5

Klärungsschritt: überwachte Arbeitsparameter

Parameter	Bevorzugtes Ziel
Trübung von Masse-filtriertem Flüssigkeitsüberstand (OD_{600})	<0,32 OD_{600}
Gesamtprotein in Masse-filtriertem Flüssigkeitsüberstand (Bradford Test)	6 mg/ml
Fusionsprotein-Konzentration in Masse-filtriertem Flüssigkeitsüberstand (Umkehrphasenanalyse)	2 mg/ml
Gesamt-DNA nach Klärung	30 ug/ml
Fache LPS-Entfernung	1000-fach

Beispiel 5 – Selektive Ausfällung

[0093] Nach dem Klärungsschritt ist es gegebenenfalls möglich, eine selektive Ausfällung des Proteins von Interesse zu verwenden. Dies wird durch Zugeben eines Volumens von 1M $ZnCl_2$ zu 19 Volumina von 4°C geklärtem Flüssigkeitsüberstand erreicht. Der pH der Suspension wird bei 7,0 mit 2,5 M Tris-Base erreicht. Nach Inkubation der Suspension für 15 Minuten wird der sich ergebende Niederschlag durch fortgesetzte Zentrifugation bei einer maximalen Zentrifugalkraft von 15000 × g, einer Sedimentationsentfernung von 2,5 cm mit einer Verweilzeit von 3 Minuten gewonnen. Der gewonnene Niederschlag wird nachfolgend in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80°C gefroren gelagert. Der Niederschlag wird nachfolgend in 20 mM Tris/100 mM EDTA (pH = 8,0) bei 20°C bei einem Verhältnis von 100 Gramm Niederschlag pro Liter Puffer gelöst. Mehr als 75% des Proteins von Interesse werden durch das Verfahren gewonnen, wie durch Umkehrphasen-HPLC gemessen.

Beispiel 6 – Reinigung

[0094] Nach dem Klärungsschritt (Beispiel 4) ist ein Verarbeitungsverfahren, welches verwendet werden kann (alternativ zu selektiver Ausfällung (Beispiel 5)) Ultrafiltration/Diafiltration unter Verwendung von Tangentialfluss Membranfiltration. Dieser Schritt konzentriert die geklärte Fusionsproteinlösung und tauscht das Protein in einen Puffer mit niedriger ionischer Stärke, der für Ionenaustausch-Chromatographie geeignet ist. Die Membran, die in der Tangentialfluss-Vorrichtung verwendet wird, dient als poröser Filter, der Substanzen auf der Basis von Molekulargewicht abtrennt. Lösungsbestandteile mit hohem Molekulargewicht (wie Proteine) werden durch die Membran zurückgehalten und Bestandteile mit niedrigem Molekulargewicht (wie anorganische Salze und Pufferverbindungen) passieren frei durch die poröse Membranstruktur und werden in dem Permeat entfernt.

[0095] Wenn ein Ersetzungspuffer zum Tangentialfluss-Retentat bei einer Geschwindigkeit zugegeben wird, die annähernd gleich der Geschwindigkeit ist, bei welcher der Puffer durch die Membran gezogen und verworfen wird, wird der anfängliche Puffer fortlaufend verdünnt (Protein-Diafiltration). Unter diesen Bedingungen werden Verbindungen mit leichtem Molekulargewicht leicht ausgetauscht und die Proteinkonzentration bleibt konstant. Die Zugabe von fünf Retentat-Volumina an Puffer ergibt einen ≥ 99% Ersatz des Anfangspuffers. Wenn Puffer aus der Tangentialfluss-Vorrichtung bei einer Geschwindigkeit gezogen wird, die schneller ist als die, bei welcher Ersetzungspuffer zu dem Retentat zugegeben wird, wird die Proteinlösung konzentriert.

[0096] Der erste Ultrafiltration/Diafiltrationsschritt (UFDF Nr. 1) des Gewinnungsverfahrens konzentriert das Fusionsprotein, welches im filtrierten, geklärten Flüssigkeitsüberstand vorhanden ist, und tauscht den Puffer aus. Dieser Verfahrensschritt verwendet eine Folge von Platte-und-Rahmen Membran-Kartuschen, zum Beispiel Millipore Pellicon regenerierte Cellulose-Kassettenfilter mit einem Membran-Molekulargewicht Abschnitt von ≤ 10 kDa. Zusätzlich werden In-line Vorfilter (Millipore Milligard, 1,2 µm Porengröße) zur kontinuierlichen Filtration des Retentats verwendet, um alle Teilchen zu entfernen, welche die Membranen verschmutzen könnten. Das Temperaturziel für diesen Schritt beträgt 8°C.

[0097] Vor der Verwendung werden der Ultrafiltrationsschlitten und Membranen mit 20 mM Tris, 0,3 M NaCl, pH 8,0 gespült, um das System zu äquilibrieren. Eine Lösung aus 4 M NaCl wird bei einem Verhältnis von 9,32 (Gew./Vol.) zum filtrierten, geklärten Flüssigkeitsüberstand (FCS) in einem Haltegefäß zugegeben, was dann gemischt wird, bevor die Verarbeitung beginnt. Der FCS wird über die Membran bei einem positiven Transmembrandruck gepumpt und das Retentat wird zum Gefäß rezirkuliert, während das Permeat zum Abfall geleitet wird. Der FCS wird annähernd dreifach konzentriert (Konzentration I). Nachdem Konzentration I abgeschlossen ist, wird ein Verdünnungsmittelstrom von 20 mM Tris, 0,3 M NaCl, pH 8,0 zu dem Haltegefäß bei einer Fließgeschwindigkeit gleich der Permeat-Fließgeschwindigkeit zugegeben (Diafiltration 1). Auf diese Weise wird der Puffer des FCS fortlaufend mit dem Verdünnungsmittelpuffer verdünnt. Wenn das Gesamtvolumen des Permeats ≥ das 5-Fache des Endvolumens von Konzentration I ist, ist Diafiltration I vollständig. Über 99% der gelösten Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht, welche in dem Ursprungspuffer vorhanden sind, werden entfernt.

[0098] Wenn Diafiltration I abgeschlossen ist, wird ein Verdünnungsmittelstrom von 20 mM Tris, pH 8,0 zum Retentatgefäß bei einer Fließgeschwindigkeit gleich der Fließgeschwindigkeit des Permeats zugegeben (Diafiltration II). Wenn das Gesamtvolumen des Permeats ≥ das 5-Fache des Endvolumens von Konzentration I ist, ist Diafiltration II abgeschlossen. Nachdem Diafiltration II abgeschlossen ist, wird das Retentat dann zusätzlich 10% konzentriert (Konzentration II). Die Ausrüstung wird mit einem ausreichenden Volumen an 20 mM Tris, pH 8,0 gespült, um die konzentrierte Proteinlösung auszuwaschen, was das Gesamtvolumen des Pools auf annähernd das 0,4-Fache des Ausgangsvolumens von FCS bringt. Der UFDF Nr. 1 Pool wird aus dem Gefäß gepumpt und durch einen im Autoklaven behandelten 0,2 µm Filter filtriert, der an einen sauberen, im Autoklaven behandelten Druckkessel angeschlossen ist. Der filtrierte Pool wird bei 2–10°C vor weiterer Verarbeitung gelagert.

[0099] Die durchschnittliche Gewinnung von Fusionsprotein aus diesem Schritt beträgt 89%. Tabelle 6 führt die Arbeitsparameter auf, die während dieses Schritts kontrolliert werden.

Tabelle 6

Arbeitsparameter, welche für den UFDF Nr. 1 Schritt kontrolliert werden

Verfahren	Parameter	Empfohlenes Ziel
Alle Verfahren	Einlass-Einspeisungsdruck	80 psig
	Retentatdruck	40 psig
	Druckabfall über Vorfilter	≤ 25 psig
	Temperatur Haltegefäß	8°C
Äquilibrierung	Retentat und Permeat pH	8,0
	Retentat und Permeat Leitfähigkeit	17-23 mS/cm
Konzentration I	Endvolumen	0,3 x Ausgangsvolumen von FCS
Diafiltration I	Retentat und Permeat pH	8,0
	Permeatvolumen	≥ 5 x Konzentration I Endvolumen
	Permeat Leitfähigkeit	17-23 mS/cm
Diafiltration II	Retentat und Permeat pH	8,0
	Permeatvolumen	≥ 5 x Konzentration I Endvolumen
	Permeat Leitfähigkeit	≤ 2 mS/cm
Konzentration II	Endvolumen nach Spülung	0,4 x Ausgangsvolumen von FCS

[0100] Die Reinigung von Protein von Interesse, zum Beispiel rhIL-11, bezieht erstens Reinigung des Fusionsproteins weg von positiv geladenen Verunreinigungen, zweitens Spaltung des Fusionsproteins in seine Bestandteile, nämlich rhIL-11 und Thioredoxin, und drittens Reinigung des Proteins von Interesse, z.B. rhIL-11 ein.

[0101] Reinigung der Fusionsform des Proteins wird mit zwei Ionenaustausch-Chromatographieschritten erreicht. Nach Spaltung des Fusionsproteins werden zwei zusätzliche Ionenaustausch-Chromatographieschritte verwendet, um die gespaltene Form des Fusionsproteins zu reinigen. Im ersten Chromatographieschritt wird ein Anionen-Austauschharz, zum Beispiel Toyopearl QAE verwendet, um das Fusionsprotein (und weitere negativ geladene Proteine) aus dem Verfahrensstrom zu adsorbieren, und im zweiten Schritt wird ein Kationen-Austauschharz, zum Beispiel S-Sepharose Fast Flow verwendet, um positiv geladene Proteine aus dem Verfahrensstrom zu adsorbieren, während Fusionsprotein durch die Säule fließt.

[0102] Toyopearl QAE 550C ist ein starkes Anionen-Austauschharz, zusammengesetzt aus einem starren polymeren Träger, der mit einem quaternären Amin kovalent derivatisiert ist. Proteine und poly-ionische Substanzen (zum Beispiel Polynukleotide und Lipopolysaccharide) mit einer negativen Nettoladung beim pH des Arbeitsgangs binden an dieses Harz als Funktion der ionischen Stärke der Lösung. Das Toyopearl QAE Harz wird verwendet, um Fusionsprotein aus dem Produktstrom unter Niedrigsalz-Bedingungen durch ionische Interaktionen zu adsorbieren. Elution des Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein wird durch sowohl Senken des pH, als auch Erhöhen der ionischen Stärke in dem passenden Puffer erreicht. Passende Eluenten schließen 20–100 mM Tris-Puffer bei pH 7,5–8,5 ein, welche 100–500 mM NaCl enthalten, oder 50–200 mM Histidinpuffer bei pH 5,5–6,6, welche 0–150 mM NaCl enthalten.

[0103] S-Sepharose Fast Flow ist ein starkes Kationen-Austausch Chromatographiegel, zusammengesetzt aus einer quervernetzten Agarosematrix, die mit Sulfonatgruppen derivatisiert ist. Verunreinigungen, sowohl Proteine, als auch polyionische Substanzen mit isoelektrischen Punkten größer als dem pH des laufenden Puffers, binden an S-Sepharose Fast Flow durch Ladungsinteraktionen.

[0104] Das Fusionsprotein wird an die QAE-Säule gebunden und dann daraus eluiert, durch die S-Sepharose Fast Flow Säule passiert und in der S-Sepharose Fast Flow ungebundenen Fraktion gewonnen. Die Bedingun-

gen zur Elution der QAE-Säule sind optimiert worden, um Bindung von Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein an das S-Sepharose Fast Flow Harz zu minimieren, während Verunreinigungen mit einem höheren pI als das Fusionsprotein an die S-Sepharose Fast Flow Säule binden und aus dem Verfahrensstrom entfernt werden.

[0105] Sowohl die Toyopearl QAE 550C Säule, als auch die S-Sepharose Fast Flow Säule werden bei Umgebungstemperatur äquilibriert und betrieben. Die S-Sepharose Fast Flow Säule wird mit 150 mM Histidin, 150 mM NaCl, pH 6,2, äquilibriert, gefolgt von einer zweiten Äquilibrierung mit 75 mM Histidin, 75 mM NaCl, pH 6,2. Als nächstes wird die Toyopearl QAE Säule getrennt von der S-Sepharose Fast Flow Säule mit 20 mM Tris, pH 8,0 äquilibriert. Das UFDF Nr. 1 Konzentrat, wie oben beschrieben, wird dann auf die äquilibrierte Toyopearl QAE Säule bei einer linearen Geschwindigkeit von ≤ 1,5 cm/Min. geladen.

[0106] Nachdem die Ladung vollständig ist, wird die Toyopearl QAE Säule mit 20 mM Tris, pH 8,0, bei ≤ 1,5 cm/Min. gewaschen. Die QAE-Säule wird dann mit 75 mM NaCl, 75 mM Histidin, pH 6,2 bei ≤ 1,0 cm/Min. eluiert. Als das Protein beginnt, aus der QAE-Säule zu eluieren, wird der Auslass der Säule an die S-Sepharose Fast Flow Säule angeschlossen. Der Tandem-Säuleneluat Peak wird als einzelner Pool gesammelt.

[0107] Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein eluiert aus den Säulen als Peak von annähernd 5 Säulenvolumina. (Das Säulenvolumen basiert auf den Dimensionen der Toyopearl QAE Säule). Tabelle 7 führt die Arbeitsparameter auf, die routinemäßig während dieses Schritts überwacht werden. Die durchschnittliche Ausbeute von Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein aus diesem Schritt ist 91%.

Tabelle 7

Arbeitsparameter, überwacht für den Toyopearl QAE/S-Sepharose Fast Flow Schritt

Verfahren	**Parameter**	**Bevorzugtes Ziel**
Säulenpackung Toyopearl QAE 550C	Betthöhe	15-19 cm
Säulenpackung S-Sepharose FF	Betthöhe	10-15 cm
Äquilibrierung Toyopearl QAE Säule	Lineare Geschwindigkeit[a]	≤1,5 cm/Min.
	pH	8,0 ± 0,2
	Volumen[b]	≥ 4 Säulenvolumina
Äquilibrierung S-Sepharose FF Säule	Lineare Geschwindigkeit[a]	≤ 4 cm/Min.
	pH (Äquilibrierung Nr. 1)	6,2 ± 0,2
	Volumen[b]	≥ 3 Säulenvolumina
	pH (Äquilibrierung Nr. 2)	6,2 ± 0,2
	Volumen[b]	≥ 3 Säulenvolumina
Ladung: UFDF Nr. 1 Konzentrat	Volumen[a]	1-2 Säulenvolumina
	Lineare Geschwindigkeit[a]	≤ 1,0 cm/Min.
Wäsche Toyopearl QAE Säule	Lineare Geschwindigkeit[a]	≤ 1,5 cm/Min.
	Volumen	3-4 Säulenvolumina
Elution	Lineare Geschwindigkeit[ab]	≤ 1,0 cm/Min.

[a]Fließgeschwindigkeit für die QAE Säulenäquilibrierung und Ladungsvolumen der QAE-Säule basierend auf den Dimensionen der Toyopearl QAE Säule.
[b]Säulenäquilibrierung wird mit zusätzlichem Puffer fortgesetzt, falls der pH außerhalb der Zielbandbreite liegt.
[c]Fließgeschwindigkeit für die S-Sepharose Säulenäquilibrierung basiert auf den Dimensionen der S-Sepharose Säule

[0108] Nach Reinigung des Fusionsproteins durch QAE Toyopearl und S-Sepharose Fast Flow Chromatographie wird das Protein chemisch gespalten, in diesem Beispiel an der Asparaginyl-Glycyl Peptidbindung in der Fusionsverbindungssequenz, um rhIL-11 und Thioresoxin zu erzeugen.

[0109] Spaltung der Asparaginyl-Glycyl Peptidbindung unter mild basischen Bedingungen unter Verwendung von Hydroxylamin als nukleophilem Reagens ist gut dokumentiert und ein allgemeines Verfahren ist beschrie-

ben worden (Bornstein, P. und Balian, G., Cleavage at Asn-Gly Bonds with hydroxylamin, Meth. Enzymol. 47 (E): 132–145 (1977)). Die Asparaginyl-Glycyl Peptidbindung ist besonders empfindlich gegenüber Hydroxylaminolyse, obwohl von Asparaginyl-Leucyl, Asparaginyl-Methionyl und Asparaginyl-Alanylspaltungen berichtet worden ist und sie relativ langsam auftreten können, Bornstein, supra.

[0110] Der Toyopearl QAE/S-Sepharose FF Eluat-Pool wird zum Spaltungsumsetzungsgefäß zugegeben. Die Hydroxylamin-Spaltungslösung, 3,0 M Hydroxylamin-HCl, 0,3 M CHES, pH 9,7, wird zu dem Gefäß bei einem Volumen gleich einer Hälfte des Volumens des Toyopearl QAE/S-Sepharose FF Eluats zugegeben, um eine Endumsetzungsgemischkonzentration von 1,0 M Hyroxylamin-HCl und 0,1 M CHES zu erzeugen. Der pH des Gemisches wird durch Zugabe von 10 N NaOH an 9,3 angepasst (gemessen bei 35°C) und die Temperatur wird auf annähernd 35°C gebracht.

[0111] Nach 9 Stunden sanfter Bewegung wird die Spaltungsumsetzung durch Verringern der Temperatur und des pH des Umsetzungsgemisches beendet. Die Temperatur des Umsetzungsgemisches wird auf ≤ 8°C verringert, während der pH des Gemisches bei 9,3 durch Zugabe einer neutralisierenden Lösung, 2,0 M TRIS, pH 7,3 kontrolliert wird. Nach Kühlen wird zusätzliche Neutralisierungslösung zugegeben, bis ein Volumen gleich einem Fünftel des Volumens des Umsetzungsgemisches zugegeben worden ist. Das Neutralisierungs-Spaltungsgemisch wird bei ≤ 8°C vor weiterer Verarbeitung gelagert. Die Spaltungsumsetzungsarbeitsparameter werden in Tabelle 8 detailliert dargestellt.

[0112] Das Ausmaß von Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein-Spaltung beträgt durchschnittlich 73%. Die Proteine, welche am hervortretendsten in dem Verfahrensstrom nach der Spaltungsumsetzung vorhanden sind, sind rückständiges, nicht gespaltenes Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein und die beiden Spaltungsprodukte rhIL-11 und Thioredoxin.

Tabelle 8

Arbeitsparameter für den Hydroxylamin Spaltungsschritt

Verfahren	**Parameter**	**Bevorzugtes Ziel**
Spaltungsbeginn	Volumen von Spaltungslösung	0,5 x Ladungsvolumen
	Bewegungsgeschwindigkeit[a]	15 U/Min.
	Anfangs pH[b]	9,3
	Temperatur	35°C
	Zeit	9 Std.
Spaltungsabkühlung	pH	9,3
	Endtemperatur	≤ 8°C
Spaltungsende	Gesamtvolumen von Neutralisierungslösung	0,2 x Umsetzungsgemisch-Gesamtvolumen

[a] Bewegungsgeschwindigkeit nachdem alle Lösungen zugegeben worden sind und die richtige Temperatur und pH erreicht wurden.

[b] Der pH wird bei 35°C bestimmt.

[0113] Nach der chemischen Spaltung des Fusionsproteins in seine Bestandteile von rhIL-11 und Thioredoxin wird der Verfahrensstrom konzentriert und in einen Puffer mit niedriger ionischer Stärke unter Verwendung eines zweiten Ultrafiltration/Diafiltrationsschritts mit Tangentialfluss-Membranfiltrations Puffer getauscht. Der zweite Ultrafiltration/Diafiltrationsschritt (UFDF Nr. 2) verwendet eine Folge von Platte-und-Rahmen Membran-Kartuschen, zum Beispiel Millipore Pellicon regenerierte Cellulose Kassettenfilter mit einem MW Abschnitt von ≤ 10 kDa. Zusätzlich werden In-line Vorfilter (Millipore Milligard, 1,2 µm Porengröße) für kontinuierliche Filtration des Retentats verwendet, um alle Feststoffteilchen zu entfernen, welche die Membranen verunreinigen könnten. Der Verfahrensschritt wird bei einer Zieltemperatur von ≤ 8°C durchgeführt. Vor der Verwendung werden der Ultrafiltrationsschlitten und Membranen mit 20 mM Tris, 0,2 M NaCl, pH 8,0, äquilibriert. Nach der Membranäquilibrierung wird das Spaltungsgemisch von dem Haltegefäß bei einem positiven Transmembrandruck über die Membran gepumpt. Das Retentat wird zu dem Haltegefäß rezirkuliert und der Permeatstrom wird zum Abfall geleitet. Dieses konzentriert das rhIL-11, welches in dem Spaltungsumsetzungsgemisch vor-

handen ist, und verringert das anfängliche Volumen durch einen Faktor von annähernd 6,5.

[0114] Nachdem die Konzentration vollständig ist, wird ein Verdünnungsmittelstrom aus 20 mM Tris, 0,2 M NaCl, pH 8,0, zum Retentatgefäß bei einer Fließgeschwindigkeit gleich der Permeat-Fließgeschwindigkeit zugegeben. Auf diese Weise wird der Spaltungsumsetzungspuffer fortlaufend mit dem Verdünnungsmittelpuffer verdünnt. Dieses Diafiltrationsverfahren wird fortgesetzt, bis das Permeatvolumen mindestens das Fünffache des konzentrierten Retentatvolumens hat. Nachdem die Diafiltration abgeschlossen ist, wird die Ultrafiltrationsausrüstung mit ausreichend 20 mM Tris, 0,2 M NaCl, pH 8,0, gespült, um die konzentrierte Proteinlösung auszuwaschen (annähernd 30–40% des konzentrierten Volumens) und der rhIL-11 Pool (konzentrierte Lösung und Spülung) wird in dem Haltegefäß gelagert, bis der nächste Verarbeitungsschritt beginnt. Die durchschnittliche Gewinnung von rhIL-11 aus diesem Schritt beträgt 89%. Tabelle 9 führt die Arbeitsparameter auf, die während dieses Schritts kontrolliert werden.

Tabelle 9

Arbeitsparameter kontrolliert für den UDFD Nr. 2 Schritt

Verfahren	**Parameter**	**Empfohlenes Ziel**
Alle Verfahren	Einlass-Einspeisungsdruck	≤ 30 psig
	Retentatdruck	10 psig
	Temperatur Haltegefäß	2°C
	Druckabfall über Vorfiltern	≤ 60 psig
Konzentration	Endvolumen	0,15 x Anfangsvolumen
Diafiltration	Permeatvolumen	≥ 5-Fache des Retentatvolumens

[0115] Nach dem UDFD Nr. 2 Schritt wird das rhIL-11 mit zwei Ionenaustausch-Chromatographieschritten gereinigt. Im ersten Schritt wird ein Kationen-Austauschharz, in diesem Beispiel CM-Sepharose Fast Flow verwendet, um das rhIL-11 aus dem Verfahrensstrom zu adsorbieren. Alle Schritte werden bei einer Temperatur von 2–8°C durchgeführt. Die Säule wird zuerst mit einem Puffer äquilibriert, welcher 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 8,0, enthält, und dann mit einem Puffer äquilibriert, welcher 20 mM Tris, pH 8,0, enthält. Der nicht gereinigte rhIL-11 Pool wird durch die CM-Sepharose Säule bei einer Geschwindigkeit von ≤ 3,2 cm/Min, gepumpt. Die Säule wird dann mit einer Lösung aus 0,15 M Glycin, pH 9,5, gewaschen. Die CM-Sepharose FF Säule wird mit 0,15 M Glycin, 0,15 M NaCl, pH 9,5, in ein Sammelgefäß eluiert, das ein bestimmtes Volumen an gereinigtem Wasser bei Umgebungstemperatur zur Verdünnung des Peaks enthält. Der Säuleneluat-Peak wird als einzelner Pool gesammelt, zu welchem zusätzliches gereinigtes Wasser bei Umgebungstemperatur zugegeben wird, um eine Endverdünnung von einem Teil Elutionspeak mit 3 Teilen gereinigtem Wasser zu erreichen. Die Gewinnung von rhIL-11 aus diesem Schritt beträgt durchschnittlich annähernd 75%. Die Säulenarbeitsparameter werden in Tabelle 10 detailliert dargestellt.

Tabelle 10

Arbeitsparameter für CM-Sepharose Fast Flow

Verfahren	Parameter	Bevorzugter Wert
Säulenpackung CM-Sepharose FF	Betthöhe	11-13 cm
Äquilibrierung 1	Lineare Geschwindigkeit	≤ 3,2 cm/Min.
	pH	7,8 - 8,2
	Volumen[a]	≥ 3,5 Säulenvolumina
	Leitfähigkeit	≥ 30 mS/cm
Äquilibrierung 2	Lineare Geschwindigkeit	≤ 3,2 cm/Min.
	pH	7,2 - 8,2
	Volumen[a]	≥ 6 Säulenvolumina
	Leitfähigkeit	≤ 4 mS/cm
Ladung	Lineare Geschwindigkeit	≤ 3,2 cm/Min.
	Volumen	4-5 Säulenvolumina
Verdünnung von Ladung	Volumen	4 x Ladungsvolumen
	Leitfähigkeit	≤ 4 mS/cm
Wäsche	Lineare Geschwindigkeit	≤ 3,2 cm/Min.
	pH	9,3-9,7
	Volumen	≥ 10 Säulenvolumina
	Leitfähigkeit	≤ 2 mS/cm
Elution	Lineare Geschwindigkeit	≤ 2 cm/Min.

[a]Säulenäquilibrierung wird mit zusätzlichem Puffer fortgesetzt, falls der pH oder Leitfähigkeitsziele nicht erreicht werden.

[0116] Der letzte Chromatographieschritt im Reinigungsverfahren ist ein Anionen-Austausch Chromatographieschritt, in diesem Beispiel Toyopearl QAE 550C, der anionische Verunreinigungen aus dem rhIL-11 Produktstrom adsorbiert. Das rhIL-11 wird in der Toyopearl QAE ungebundenen Fraktion gewonnen.

[0117] Säulenarbeitsgänge werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Toyopearl QAE 550C Säule wird zuerst mit 1M Glycin, pH 9,5 und dann mit 40 mM Glycin, pH 9,5 äquilibriert. Der verdünnte CM-Sepharose Peak wird durch die Säule gepumpt und mit zusätzlichem 40 mM Glycin, pH 9,5 gejagt, um das verbleibende rhIL-11 in der Ladung aus der Säule zu waschen. Der Abfluss der nicht gebundenen Ladung und die Wäsche werden in einem Lagergefäß gesammelt. Dieser Pool wird dann durch die Zugabe von 5% (Vol./Vol.) 870 mM NaH_2PO_4, pH 5,0 neutralisiert. Säulenarbeitsparameter werden in Tabelle 11 detailliert dargestellt.

[0118] Gewinnung von rhIL-11 für diesen Schritt beträgt durchschnittlich annähernd 95%. Thioredoxin/rhIL-11 Fusionsprotein, das vor diesem Schritt nicht entfernt wird, wird beständig auf einen Grad unter Nachweis durch SDS-PAGE entfernt. Der Eluat-Pool enthält hochgradig gereinigtes rhIL-11 mit geringeren Mengen (< 5%) von rhIL-11 Molekülen mit kürzeren Längen.

Tabelle 11

Arbeitsparameter für den Toyopearl QAE Schritt

Verfahren	Parameter	Bevorzugtes Ziel
Säulenpackung Toyopearl QAE 550C	Betthöhe	20-22 cm
Äquilibrierung 1	Volumen	≥ 1,3 Säulenvolumina
	Lineare Geschwindigkeit	≤ 2,6 cm/Min.
Äquilibrierung 2	pH	9,3 - 9,7
	Leitfähigkeit	≥ 11 mS/cm
	Volumen[a]	≥ 3 Säulenvolumina
	Lineare Geschwindigkeit	≤ 2,6 cm/Min.
Ladung	Volumen	≤ 7,5 Säulenvolumina
	Temperatur	≥ 15°C
	Lineare Geschwindigkeit	≤ 2,6 cm/Min.
Wäsche	Lineare Geschwindigkeit	≤ 2,6 cm/Min.
Neutralisierung	Volumen der Neutralisierungslösung	5% (Vol./Vol.) von Durchfluss-Pool

[a] Säulenäquilibrierung wird mit zusätzlichen 40 mM Glycin, pH 9,5 fortgesetzt, falls der pH oder Leitfähigkeitsziele nicht erreicht werden.

[0119] Während die vorliegende Erfindung bezüglich spezifischer Verfahren und Zusammensetzungen beschrieben worden ist, versteht es sich, dass Variationen und Modifikationen den Fachleuten bei Erwägung der vorliegenden Erfindung begegnen werden. Die wirksamen Reagenskonzentrationen, pH und Temperaturen sind Verfahrens- und Protein-spezifisch und können leicht gemäß der Art der anionischen Verunreinigungen und chemischen Merkmale und Stabilität des Proteins von Interesse angepasst werden, wie einem Fachmann leicht ersichtlich ist.

[0120] Von zahlreichen Modifikationen und Variationen der Erfindung wie in den obigen veranschaulichenden Beispielen beschrieben wird erwartet, dass die den Fachleuten begegnen werden, und demzufolge sollten nur solche Einschränkungen, wie sie in den angehängten Ansprüchen erscheinen, darauf angewendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Reinigen eines Proteins von Interesse, wobei ein Protein vor der Spaltung negativ geladen ist und einen Thioredoxin-Fusionspartner umfasst, und besagtes Protein von Interesse nach der Spaltung positiv geladen ist, welches die Schritte umfasst:
Binden von besagtem negativ geladenen Protein an ein erstes Anionen-Austauschharz,
Eluieren von besagtem negativ geladenen Protein mit einem ersten Eluent, um ein erstes Eluat zu bilden,
Auftragen von besagtem ersten Eluat auf ein erstes Kationen-Austauschharz,
Sammeln von besagtem negativ geladenen Protein in einer ungebundenen Fraktion von besagtem ersten Kationen-Austauschharz,
Spalten von besagtem negativ geladenen Protein, um ein positiv geladenes Protein zu bilden
Binden von besagtem positiv geladenen Protein an ein zweites Kationen-Austauschharz,
Eluieren von besagtem positiv geladenen Protein mit einem zweiten Eluent, um ein zweites Eluat zu bilden,
Auftragen von besagtem zweiten Eluat auf ein zweites Anionen-Austauschharz und
Sammeln von besagtem positiv geladenen Protein in einer ungebundenen Fraktion von besagtem zweiten Anionen-Austauschharz.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei besagtes Protein von Interesse IL-11 umfasst.

3. Verfahren nach entweder Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die besagten ersten und besagten zweiten Anionen-Austauschharze Anionen-Austauschharze mit positiv geladenen Mitgliedern sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Diethylaminoethan (DEAE), Polyethylenimin (PEI) und quaternärem Aminoethan (QAE).

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die besagten ersten und zweiten Kationen-Austauschharze Kationen-Austauschharze mit negativ geladenen Mitgliedern sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sulfonyl, Sulfylpropyl (SP), Carboxyl und Carboxymethyl.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei besagtes Anionen-Austauschharz Toyopearl QAE ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei besagtes erstes Kationen-Austauschharz 5 Sepharose Fast Flow ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei besagtes zweites Kationen-Austauschharz CM Sepharose Fast Flow ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei besagter erster Eluent ein Mitglied, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
(a) 20 bis 100 mM Tris, bei pH 7,5 bis 8,5, 100–500 mM NaCl und
(b) 50 bis 200 mM Histidinpuffer, bei pH 5,5 bis 6,6, 0 bis 150 mM NaCl ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, wobei besagter zweiter Eluent 50 bis 300 mM Glycinpuffer, pH 9,0 bis 10,0 und 100 bis 500 mM NaCl ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zum Reinigen von IL-11, welches die Schritte umfasst:
Binden von Thioredoxin-IL-11 an Toyopearl QAE,
Eluieren mit 75 mM NaCl, 75 mM Histidin, pH 6,2,
Auftragen von besagtem ersten Eluat auf S Sepharose Fast Flow,
Sammeln von besagtem Thioredoxin-IL-11 in einer ungebundenen Fraktion von besagtem S Sepharose Fast Flow,
Spalten von besagtem Thioredoxin-IL-11 Fusionsprotein, um positiv geladenes IL-11 zu bilden,
Binden von besagtem positiv geladenen IL-11 an CM Sepharose Fast Flow,
Eluieren von besagtem IL-11 mit 0,15 M Glycin, 0,15 M NaCl, pH 9,5,
Auftragen von besagtem zweiten Eluat auf Toyopearl QAE und
Sammeln von besagtem IL-11 in einer ungebundenen Fraktion von besagtem Toyopearl QAE.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen