(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102869767 B
(45)授权公告日 2016.03.09

(21)申请号 201180013665.0
(22)申请日 2011.01.31
(30)优先权数据
10382019.7 2010.02.01 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.09.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/ES2011/070057 2011.01.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/092367 ES 2011.08.04
(73)专利权人 迪格纳生物技术公司
地址 西班牙纳瓦拉
(72)发明人 巴尔达斯·阿尔吉尔达斯·布梅里斯
(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200
代理人 楼高潮
(51)Int.Cl.
C12N 1/38(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

(56)对比文件
US 20060188477 A1,2006.08.24,
Korz D J et al..Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli.《Journal of Biotechnology》.1995, 第59-65页,尤其是第60页第2竖栏,表1.

审查员 管冰

权利要求书1页 说明书20页 附图12页

(54)发明名称

干扰素 α5的制备方法

(57)摘要

一种在产生IFNa5的大肠杆菌宿主细胞中通过表达产生干扰素 α5(IFNa5)蛋白质的方法,该方法使得多肽链的N-末端的额外甲硫氨酸残基的掺入以及氧化类型的产生最小化。IFNa5蛋白质可以使用有效的方法来纯化从而产生有生物活性的IFNa5。

CN 102869767 B

1. 一种在大肠杆菌宿主细胞中通过表达来生产干扰素 α 5(IFNa5) 蛋白质的方法，其包括：

a) 提供一种产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞；

b)在通过所述产生 IFNa5 的重组大肠杆菌宿主细胞中有效表达所述 IFNa5 蛋白的条件下，在发酵培养基中培养该产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞，所述培养基添加碳料液，其中

- 所述发酵培养基不含动物来源或酵母来源的成分，并且

- 所述碳料液包含碳源和每升添加的碳料液中 90 至 111mg 的 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$， 12.15 至 14.985mg 的 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，20.25 至 24.975mg 的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$， 4.5 至 5.55mg 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$，9 至 11.1mg 的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，3.42 至 4.218mg 的 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$， 0.9 至 1.11mg 的 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 和 2.07 至 2.553mg 的 H_3BO_3；以及

c) 分离，以及任选地纯化，表达的 IFNa5 蛋白质。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中大肠杆菌宿主细胞用包含在诱导型启动子调控下的 IFNa5 蛋白质的编码序列的载体来进行转化。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中大肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中宿主细胞是大肠杆菌 Ion /ompT 蛋白酶缺陷型宿主菌株。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中所述菌株是大肠杆菌 BL21 菌株。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中所述菌株是大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株。

7. 根据权利要求 3 的方法，其中大肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株，并且步骤 b) 的条件中包括使用 IPTG 诱导。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中在诱导之后的培养物生长率 μ 等于或高于 0.17。

9. 根据权利要求 8 的方法，其中再折叠后的氧化甲硫氨酸 IFNa5 的数量为 1% 或更低。

10. 根据权利要求 1 的方法，其中所述 IFNa5 蛋白质是 hIFNa5。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中 IFNa5 蛋白质具有如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中从包含包涵体 (IB) 形式的 IFNa5 蛋白质的混合物中分离并且纯化 IFNa5 蛋白质，通过将所述 IB 进行增溶来形成包含变性 IFNa5 的混合物，随后进行氧化复性处理过程形成包含复性 IFNa5 的混合物，并且对包含所述复性 IFNa5 的混合物进行纯化从而获得纯化的 IFNa5。

13. 根据权利要求 12 的方法，其中包含复性 IFNa5 的混合物通过将所述混合物进行 4- 步色谱处理方法来纯化，其包括：

1) 将所述包含复性 IFNa5 的混合物进行疏水作用层析；

2) 将步骤 1) 获得的溶液进行阴离子交换色谱；

3) 将步骤 2) 获得的溶液进行第一阳离子交换色谱；以及

4) 将步骤 3) 获得的溶液进行第二阳离子交换色谱，其中所述溶液任选地，用包含甲硫氨酸的缓冲液进行稀释。

干扰素 α5 的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在生产 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞中通过表达来生产干扰素 α5（IFNa5）蛋白质的方法，其中该多肽链的 N- 末端的额外的甲硫氨酸残基的掺入以及其氧化类型的产生均为最小化的。IFNa5 蛋白质可以使用有效的方法来纯化从而产生生物学上有活性的 IFNa5。

背景技术

[0002] 干扰素（IFN）是一组天然产生的多效糖蛋白，被称为细胞因子，不同种类的细胞（上皮细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、巨噬细胞）在受到一系列的刺激（病毒、细菌、细胞、肿瘤和大分子）诱导之后会分泌产生，并且具有抗病毒、抗增殖和免疫调节特性以及镇痛作用。在内源产生或给药之后，干扰素与细胞表面的特异性受体相互作用，并开始信号从细胞质到达细胞核的转导，诱导编码具有抗病毒和免疫刺激活性的特定蛋白质的基因的表达。人们已经认识到了 IFN 的医用潜力，如许可在人体上施用的一些不同种类的 IFN，例如作为药物来治疗多发性硬化的 IFN1a（Rebif，Avonex）、IFN1b（Betaseron），以及作为药物来治疗恶性病（癌症）和病毒病的重组人 IFNa2a（Roferon A）和 IFNa2b（Intron A）。

[0003] 基于 IFN 通过其来传递信号的受体的种类，人 IFN 分为三个主要的类型，即，(i) IFN I 型 [所有的 I 型 IFN 结合到被称为 IFN-α 受体 (IFNAR) 的特异性的细胞表面受体复合体上（人类体中的 I 型 IFN 为 IFNα（IFN-α）、IFNβ（IFN-β）和 IFNω（IFN-ω）], (ii) IFN II 型 [II 型 IFN 结合到 IFN-γ 受体（IFNGR）（人体中的 II 型 IFN 为 IFNγ（IFN-γ）], 以及 IFN III 型 [III 型 IFN 通过由 IL10R2 和 IFNLR1 组成的受体复合体传递信号]。被称为 I 型 IFN 的 IFNα 和 β 在结构上相关，在酸性 pH 中稳定，并且竞争相同的细胞受体（IFNAR）。

[0004] 目前，IFNα、β 和 γ 可以通过重组的形式来制备，这具有双重优势，可以获得比通过从天然来源（白细胞、成纤维细胞、淋巴细胞）分离的高出很多数量的产物，并且降低了纯化和检测产物安全性的方法的复杂程度。事实上，大部分市售药用级重组体 IFN 是由大肠杆菌产生并纯化获得的。

[0005] 大肠杆菌重组蛋白质表达系统已经是，并且仍然是，生产 IFN 所选择的系统。实际上，IFN 基因没有内含子，并且蛋白质产物一般是非糖基化的。而且，大肠杆菌可以迅速地生长到高细胞密度，并且被用来生产重组蛋白质的菌株已经进行了遗传修饰，从而一般认为其对于大规模的发酵是安全的。

[0006] IFN cDNA 的表达是在其最初被克隆之后不久在大肠杆菌中直接完成的 [Goedell 等 Nature.，287，411-416，1980 ；Pestka，S. Arch. Biochem. Biophys.，221(1)，1-37，1983 ；Mizoguchi 等 DNA.，4，221-32，1985 ；Pestka 等 Ann. Rev. Biochem.，56，727-777，1987 ；Baron 和 Narula. Critical reviews in Biotechnology，10(3)，179-190，1990]。事实上，IFNα (IFNa) 是最先通过大肠杆菌用 DNA 重组技术的方法产生的蛋白质之一 [Derynck 等，Nature，287，193-197，1980 ；Nagata 等，Nature，284，316-320，1980]。

[0007] 然而，IFN 在大肠杆菌中的表达显示出了一些问题。在大肠杆菌中大量表达的 IFN 经常沉淀形成不溶的被称为包涵体（IB）的聚集体 [Swaminathan 等，Prot Express. Purif. 15, 236-242, 1999 ; Bedarrain 等，Biotechnol. Appl. Biochem., 33, 173-182, 2001 ; Srivasta 等 Prot. Express. Purif 41, 313-322, 2005] 简言之，一般情况下，形成错误折叠的蛋白质，因此在生物学上不具有活性 [Villaverde 和 Carrio, Biotechnol. Lett., 25, 1385-1395, 2003]。为了得到天然形式的蛋白质，需要将所述的 IB 进行变性处理，随后进行复性、氧化，如果那样的话，需要形成如在天然蛋白中的二硫键。而且，靶蛋白序列（例如，IFN）N- 末端的另外的甲硫氨酸残基的掺入是在大肠杆菌中表达蛋白质的一个特征。众所周知，分布在蛋白质序列中的甲硫氨酸残基易于氧化。这些步骤可能发生在生产蛋白质或包含所述蛋白质的药物组合物（如果其能被用作药物，例如 IFN）的过程中，并且更多发生在高温下长期保存的时期内。

[0008] 虽然已经开发了多种在细菌中生产和纯化 IB 形式的 IFN 的方法 [例如，Thatcher 和 Panayotatos, Methods Enzymol. 119, 166-177, 1986 ; US4511502 ; US 4765903 ; US 4845032 ; EP 1310559 ; 或 EP 1990349]，但是还存在阻碍成功生产和 IFN，即治疗水平的 IFN 的其他因素，例如必须清除在目标 IFN 的 N- 末端掺入的额外甲硫氨酸残基以及产生的其氧化类型（如果该产物用作药），因此降低了 IFN 生产的总得率，增加了纯化过程的复杂性，并且使得生产和纯化治疗水平的 α IFN 的方法很费力。

[0009] 因此，仍需要能够在大肠杆菌宿主细胞中以高得率和经济有效的方式来生产治疗水平的 IFNa，特别是 IFNa5 的方法。

[0010] 发明概述

[0011] 发明人出人意外地发现，发酵培养基中的微量元素（痕量元素）的浓度在 IFNa5 的翻译后修饰中起了重要的作用。因此，控制发酵培养基中的微量元素的浓度，可能使产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞中 IFNa5 的 N- 末端的额外的甲硫氨酸残基的掺入最小化，并且使其氧化类型的产生最小化，提高产品得率并简化纯化过程，因此使得在产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞中以经济有效复杂度低的方法来生产和纯化 IFNa5，即治疗水平的 IFNa5。

[0012] 实施例 4 示出了氧化甲硫氨酸化的人 IFNα-5(hIFNa5) 形式的形成被有效清除，并且乙酰化的 hIFNa5 形式的量降低了两倍（即成为原来的一半），其中 1 升 (L) 的碳料液包含大约 3.0mL 至大约 3.7mL 的微量元素原液，并且，优选地，在诱导之后的平均特定培养物生长率（μ）等于或大于 0.17。

[0013] 因此，一方面，本发明涉及在产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞中表达干扰素 α5(IFNa5) 蛋白质的方法，其包括 ：

[0014] a）提供一种产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞 ；

[0015] b）在通过所述产生 IFNa5 的重组大肠杆菌宿主细胞中有效表达所述 IFNa5 蛋白的条件下，在发酵培养基中培养该产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞，所述发酵培养基添加碳料液，其中

[0016] - 所述发酵培养基不含动物来源或酵母来源的组分，并且

[0017] - 所述碳料液包括碳源以及每升添加的碳料液中大约 3.0 至大约 3.7mL 的微量元素溶液 ；并且

[0018] c）分离和任选地纯化表达的 IFNa5 蛋白质。

[0019] 在一个特定的具体实施方式中，所述大肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株，如大肠杆菌 Ion /ompT 蛋白酶缺陷型宿主菌株，优选为大肠杆菌 BL21 菌株，最优选大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株。

[0020] 在另一个特定的具体实施方式中，当大肠杆菌菌株是大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株时，步骤 b) 的条件包括用 IPTG 诱导。

[0021] 在另一个特定的具体实施方式中，步骤 c) 分离和纯化表达的 IFNa5 蛋白质包括依次地，在裂解大肠杆菌宿主细胞之后，通过将所述 IB 进行增溶来分离所述的包涵体形式的 IFNa5 蛋白质 (IB)，并将获得的混合物进行氧化复性，以及进行连续的一系列色谱法，以获得纯化的 IFNa5，所述色谱法包括 ：

[0022] 1）将包括复性的 IFNa5 的混合物进行疏水作用层析 ；

[0023] 2）将步骤 1）获得的溶液进行阴离子交换色谱 ；

[0024] 3) 将步骤 2）获得的溶液进行第一阳离子交换色谱 ；并且

[0025] 4）将步骤 3）获得的溶液进行第二阳离子交换色谱，任选地，其中所述溶液用包括甲硫氨酸的缓冲液进行稀释，

[0026] 在一个特定的具体实施方式中，所述 IFNa5 是，优选是，人 IFNa5(hIFNa5)。

附图说明

[0027] 图 1 示出了构建 IFNa5 产生菌株的流程图。

[0028] 图 2 示出了初始质粒 DNA pET28-IFNα-5 的限制性内切酶酶切分析结果。泳道 1-3 和 5-7 ：pET28-IFN α-5 的限制性内切酶酶切分析 ；泳道 1 和 5 ：pET28-IFN α-5/BamHI ；泳道 2 和 6 ：pET28-IFN α-5/NdeI ；泳道 3 和 7 ：pET28-IFN α-5/NdeI+BamHI ；泳道 4 和 8 ：pET28-IFN α-5，未切割。DNA 分子标记 (Gene Ruler DNA Ladder Mix，Fermentas，Lithuania）条带的大小以千碱基对（kbp）来表示。

[0029] 图 3 示出了中间物质粒 IFN α-5 的限制性内切酶酶切分析结果。该质粒源于单克隆。DNA 分子标记 (Gene Ruler DNA Ladder Mix，Fermentas，Lithuania) 条带的大小以 kbp 表示。预期的片段大小（以 bp 计）在括号内给出。泳道 1 ：pUC57-IFN α-5/PstI(28 ；3197) ；泳道 2 ：pUC57-IFN α-5/PvuII(455 ；406 ；2364) ；泳道 3 ：pUC57-IFNα-5/NdeI(250 ；2975)。

[0030] 图 4 示出了为了在大肠杆菌中优化表达，通过用在大肠杆菌中使用频率最少的密码子替换掉一些密码子之后的人 IFN α-5(hIFNa5) 编码片段的完整核苷酸序列。核苷酸置换处加了下划线。

[0031] 图 5 示出了质粒 pET21-IFN α-5. 的限制性内切酶酶切分析结果。该质粒源于单克隆。DNA 分子量标准（Gene Ruler DNA Ladder Mix，Fermentas，Lithuania) 的条带大小以 kbp 指示。预期的预计的片段大小（以 bps 计）在括号中给出。泳道 1 ：pET21-IFN α-5/PagI(673 ；；817 ；；1008 ；；3423) ；泳道 2 ：pET21-IFN α-5/PstI(1352 ；4569) ；泳道 3 ：pET21-IFN α-5/NdeI+BamHI(516 ；5405)。

[0032] 图 6 示出了重组 IFNa5 蛋白质的表达。从 9 个克隆中（1-9）挑选出的大肠杆菌 BL21(DE3)pET21-IFN α-5 的细胞培养物在 750mL 烧瓶中 37° C 下培养（LB 培养基，体积 250mL)，直到 OD600 大约 1.2。靶蛋白的表达用 1mM IPTG 诱导 2.5 小时。总的细胞蛋白质

样品与 BioRad 蛋白质标记(在左侧以 kDa 为单位表示)一起进行 15%SDS-PAGE,之后用考马斯蓝染色。

[0033] 图 7 示出了重组 hIFNa5 的生物合成的流程图。

[0034] 图 8 示出了在 hIFNa5 蛋白质的还原(图 8A)和非还原(图 8B)条件下,通过 SDS-PAGE(14%)测得的根据本发明的步骤和配方来制备的重组 hIFNa5 的纯度(该图示出了 3 个大规模的纯化批次的 hIFNa5 蛋白质的结果)。

[0035] 图 9 示出了通过“反相 - 高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析测得的根据本发明的步骤和配方来制备的重组 hIFNa5 的纯度(该图示出了 3 个大规模批次的重组 hIFNa5 的结果)。

[0036] 图 10 示出了通过“分子筛 -HPLC”(SE-HPLC) 分析测得的根据本发明的步骤和配方制备的重组 hIFNa5 的纯度(该图示出了 3 个大规模批次的重组 hIFNa5 的结果)。

[0037] 图 11 示出了通过等电点聚焦电泳测得的根据本发明的步骤和配方制备的重组 hIFNa5 的纯度(该图示出了 3 个大规模批次的重组 hIFNa5 的结果)。泳道 1,11 :pI 标准品(Amersham Pharmacia);泳道 2,3,4 :重组 hIFNa5,15μg;泳道 5,6,7 :重组 hIFNa5,5μg;泳道 8,9,10 :重组 hIFNa5,1μg。

[0038] 图 12 示出了 3 个大规模生产批次的根据本发明纯化和配制的重组 hIFNa5 制剂的肽段图色谱。

[0039] 发明详述

[0040] 定义

[0041] 为了更好地理解本发明,在此提供了本发明中使用的一些术语和表述的含义。

[0042] 此处使用的术语“干扰素 α5”(或“IFNα5”或“IFNa”)指的是一种由白细胞产生的蛋白质,白细胞主要涉及抗病毒感染的先天的免疫应答,能够结合到称为 IFNa 受体 (IFNAR) 的特异性细胞表面受体复合体上。

[0043] IFNa5 蛋白质,在例如 WO 83/02459(hIFNa5) 中进行了描述。

[0044] 术语“IFNa5”包括这样的蛋白质,该蛋白质具有 (i) 至少实质上与天然 IFNa5 蛋白质的氨基酸序列相同的氨基酸序列以及 (ii) 具有与天然 IFNa5 共同的生物活性。实质相同的氨基酸序列的意思是序列相同或有一或多个氨基酸改变而不同(即,缺失、添加、替换),这些改变没有使得该人工合成蛋白质和天然 IFNa5 之间产生不利的功能差异,例如,IFNa5 蛋白质与引用的 IFNa5 蛋白质具有至少 70% 的同一性。IFNa5 蛋白质 (P) 和参考的 IFNa5 蛋白质 (R) 之间的 X% 的同一性,意思是当两个序列比对时,P 的 X% 的氨基酸与 R 的对应的氨基酸序列相同,或由相同基团的氨基酸取代,例如 :

[0045] 非极性 R 基团的氨基酸 :丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸 ;

[0046] 不带电荷的极性 R 基团氨基酸 :甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺 ;

[0047] 带电荷的极性 R 基团氨基酸(在 pH 6.0 时带负电荷):天冬氨酸,谷氨酸 ;

[0048] 碱性氨基酸 (在 pH 6.0 时带正电荷):赖氨酸、精氨酸、组氨酸(在 pH 6.0);

[0049] 具有苯基的氨基酸 :苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸。

[0050] 特别优选的保守置换为 :

[0051] 赖氨酸与精氨酸的互换,从而可保持正电荷 ;

[0052] 谷氨酸和天冬氨酸的互换，从而可保持负电荷；

[0053] 丝氨酸和苏氨酸的互换，从而保持游离 -OH；以及

[0054] 谷氨酰胺和天冬酰胺的互换，从而保持游离的 NH_2。

[0055] 这些序列同一性的百分比可通过使用 BLAST 程序来获得（blast2seq，缺省参数）[Tatutsova 和 Madden，FEMS Microbiol.Lett.，174，247-250（1990）]。

[0056] 此处使用的术语“产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞”指的是这样一种大肠杆菌宿主细胞，其已经进行了遗传工程改造，以生产具有与 IFNa5 相关的生物活性的蛋白质。在一个特定的具体实施方式中，大肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株，例如大肠杆菌 Ion /ompT 蛋白酶缺陷型宿主菌株，优选为大肠杆菌 BL21 菌株，最优选大肠杆菌 BL21（DE3）菌株。

[0057] 此处使用的术语“IFNa5 的生物活性”指的是所述 IFNa5 的任意的生物活性，包括所述 IFNa5 的治疗活性。WO 83/02459 公开了 IFNa5 显示了抗 DNA 和 RNA 病毒的抗病毒活性，细胞生长活性和调节细胞内酶和其它细胞产生物质的生产；因此，可以推测 IFNa5 可用来治疗病毒感染（例如慢性乙型肝炎感染），肿瘤和癌症。

[0058] 此处使用的表述发酵培养基为“不含动物来源或酵母来源的成分”指的是没有通过医药产品引起海绵状脑的传染因子的风险，没有任何证据证明有与药物产品有关的 BSE 污染或 vCJD 的情形。产品不含有来自酵母细胞的痕量的污染蛋白质。

[0059] 生产 IFNa5 的方法

[0060] 一方面，本发明涉及在产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞中通过表达来生产干扰素 α 5（IFNa5）蛋白质的方法，下文称为“本发明的方法”，其包括：

[0061] a）提供一种产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞；

[0062] b）在通过所述产生 IFNa5 的重组大肠杆菌宿主细胞中有效表达所述 IFNa5 蛋白的条件下，在发酵培养基中培养该产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞，所述发酵培养基添加碳料液，其中

[0063] - 所述发酵培养基不含动物来源或酵母来源的成分，并且

[0064] - 所述碳料液包含碳源和每升添加的碳料液中大约 3.0 至大约 3.7mL 的微量元素溶液；以及

[0065] c）分离，以及任选地纯化，该表达的 IFNa5 蛋白质。

[0066] 可根据本发明的方法生产的重组 IFNa5 在前文中已经定义过。在一个特定的具体实施方案中，所述可根据本发明的方法生产的重组 IFNa5 是一种与天然 IFNa5 实质上相同的 IFNa5 蛋白质，即，由产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞产生的蛋白质，该细胞已经使用 IFNa5 编码基因或其修饰体进行了转化，其编码的蛋白质具有 (1) 氨基酸序列至少实质上与天然 IFNa5 的氨基酸序列相同以及 (2) 与天然 IFNa5 共有的生物活性。在一个优选的具体实施方案中，所述 IFNa5 是 hIFNa5。

[0067] 在一个更优选的特定的具体实施方式中，根据本发明的方法生产的重组 IFNa5 为具有 SEQ ID NO：1 （图 4）所示的氨基酸序列的 IFNa5，其对应于在多肽链的 N- 末端有额外甲硫氨酸残基的成熟的 hIFNa5。

[0068] 根据本发明的方法，提供了一种产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞 [步骤 a)]。虽然，原则上，任意大肠杆菌菌株均可用于本发明的方法中，在一个优选的具体实施方案中，该大

肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株，例如大肠杆菌 Ion /ompT 蛋白酶缺陷型宿主菌株，优选为大肠杆菌 BL21 菌株，最优选大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株。

[0069] 产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞可以通过常规的用于克隆和表达 IFNa5 的方法和步骤来获得［例如，Sambrook 等 Molecular cloning:ALaboratory Manual.Second ed.,CSH Laboratory,Cold Spring Harbor,1989 ;Current Protocols in Molecular Biology,vol.1-3(Ausubel F.M. 等 ,ed.)John Wiley & Sons,Inc.,Brooklyn,New York,1994-1998］。在一个特定的具体实施方案中，IFNa5 编码基因的克隆和表达以及产生重组 IFNa5 蛋白质的菌株（即，产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞）的构建可以按照下述方法进行，所述方法包括克隆编码 IFNa5 的 cDNA 基因，修饰所述基因的 DNA 序列以优化其在大肠杆菌中的表达，构建表达质粒，将该选择质粒转化入合适的大肠杆菌菌株中以及选择表达 / 诱导条件。实施例 1 公开了产生 hIFNa5 的大肠杆菌宿主细胞的构建。

[0070] 在一个特定的具体实施方案中，当大肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌蛋白酶缺陷型菌株，例如大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株时，所述宿主细胞用包含在诱导型启动子控制之下的编码 IFNa5 蛋白质的序列的载体进行了转化 ；在该方案中，蛋白质的表达需要添加诱导物，例如，举例来说，异丙基 -β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG)。因此，根据一个特定的具体的实施方式，当大肠杆菌宿主细胞是大肠杆菌 BL21 菌株，例如大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株时，步骤 b) 的条件包括用 IPTG 诱导。

[0071] 在本发明的方法的步骤 b)中，在通过所述产生 IFNa5 的重组大肠杆菌宿主细胞中有效表达所述 IFNa5 蛋白的条件下，在发酵培养基中培养该产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞，所述培养基添加碳料液，其中

[0072] - 所述发酵培养基不含动物来源或酵母来源的成分，并且

[0073] - 所述碳料液包含碳源和每升添加的碳料液中大约 3.0 到大约 3.7mL 的微量元素溶液 ；以及

[0074] 产生 IFNa5 的大肠杆菌宿主细胞表达所述 IFNa5 蛋白质需要培养的有效条件，通常来讲，是本领域技术人员已知的。所述条件包括发酵培养基，其包括氮源、碳源和金属离子，适合培养大肠杆菌宿主细胞，并包含附加条件，根据本发明，所述发酵培养基不含有动物来源或酵母来源的组分，例如合成的化学发酵培养基。

[0075] 在一个特定的具体实施方式中，磷酸氢二铵和氨，单独或组合使用，可以用作氮源。在另一个特定的具体实施方案中，碳源可以是柠檬酸、葡萄糖，或其组合。

[0076] 实施例 2 公开了培养产生 IFNa5 的产生大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株的一种发酵培养基，所述培养基包括磷酸氢二铵、硫酸镁、磷酸二氢钾、柠檬酸、D(+)- 葡萄糖和微量元素原液，其中所述微量元素原液包含选自由铁、钙、锌、锰、铜、钴、钼、硼及其组合组成的微量元素组中的微量元素。在一个特定的具体实施方式中，所述发酵培养基包括微量元素源，其选自由氯化铁 (III)、氯化钙、硫酸锌 (II)、硫酸锰 (II)、硫酸铜 (II)、氯化物钴 (II)、钼酸钠、硼酸及其组合组成的微量元素源组中的微量元素。在一个特定的具体实施方式中，该微量元素（痕量元素）原液包含 (g/L) ：六水合氯化铁 (III)(30.0)、二水合氯化钙 (4.05)、七水合硫酸锌 (II)(6.75)、一水合硫酸锰 (II)(1.5)、五水合硫酸铜 (II)(3.0)、六水合氯化钴 (II)(1.14)、二水合钼酸钠 (0.3) 和硼酸 (0.69)［实施例 4］。

[0077] 本发明的方法的另一个特征是碳料液包括碳源和每升添加的碳料液中添加从大

约3.0mL至大约3.7mL的微量元素溶液。所述微量元素溶液的详情在上文已经进行了定义。在一个特定的具体实施方案方式中，碳料液包括碳源(例如，柠檬酸和/或葡萄糖)，硫酸镁和，根据本发明，浓缩的微量元素溶液，添加浓度为每升碳料液大约3.0mL到大约3.7mL的微量元素溶液。如上所述，实施例2和4公开了微量元素储原液包括选自由铁、钙、锌、锰、铜、钴、钼、硼和其组合组成的微量元素组中的微量元素；在一个特定的具体的实施方式中，所述微量元素原液包括氯化铁(III)、氯化钙、硫酸锌(II)、硫酸锰(II)、硫酸铜(II)、氯化钴(II)、钼酸钠、硼酸和其组合。在一个特定的具体的实施方案方式中，所包括的微量元素储原液包括浓度为每升碳料液中大约3.0mL到大约3.7mL的微量元素溶液，是实施例2和4中公开的微量元素储原液。实施例2公开了由生产生菌株生物合成hIFNa5的方法。

[0078] 发明人进行的不同的研究显示了微量元素在重组IFNa5(例如，hIFNa5)的翻译后修饰中的影响，即，在大肠杆菌中产生的重组IFNa5(例如重组hIFNa5)的纯化的API中发现的氧化的-甲硫氨酸的相对量与在多肽链的N-末端的“未处理的甲硫氨酸”的数量紧密相关。为了获得小于10%的N-末端上的所述的“未处理的甲硫氨酸”，再折叠之后的氧化-甲硫氨酸IFNa5的数量(由RP-HPLC确定)的组成将不超过1%。

[0079] 在优化重组hIFNa5生物合成方法的过程中，发明人注意到了发酵培养基中的微量元素的浓度在hIFNa5的翻译后修饰上具有重要的影响。事实上，当1L碳料液包含3.0mL-3.7mL所述的微量元素原液时或当在0.0048mL/L/o.u-0.0070mL/L/o.u.[o.u.:光学单位]的限度内时，确定了氧化甲硫氨酸hIFNa5形式(氧化-甲硫氨酸hIFNa5)的形成被消除，并且乙酰化hIFNa5形式的数量减少了两倍(一半)。

[0080] 在一个特定的具体实施方式中，本发明的方法在如下条件下进行，其中在诱导之后的平均“特定培养物生长速率”(μ)等于或高于0.17[μ:((In OD2-InOD1)/T2-T1))，其中OD是“光密度”(光学单位，o.u.)，T是“时间”)。发明人进行的研究显示了培养物生长和微量元素的浓度是紧密相关，特别是当微量元素的浓度极低/接近极限时。当培养基中的微量元素的浓度低于0.95mL/L最终悬浮液体积(实施例4，表3)或低于3.0mL/L碳料液时，在诱导之后的平均μ仅达到0.121-0.158，即，小于0.17(M-83、M-84、M-85、M-86)。然而，当诱导之后的平均μ小于0.17时，实际上氧化甲硫氨酸IFNa5形式会的出现是许可的。培养基中微量元素的浓度高于1.23mL/L最终悬浮液体积时使得生长更快(M-89，M-90)，WCW更大和乙酰化IFNa5形式+未知的蛋白质数量更大。然而，当诱导之后的平均μ等于或高于0.17时，该方法运行良好，直到微量元素的浓度高于0.123mL/L最终悬浮液体积或高于3.7mL/L碳料液。

[0081] 本发明的方法的步骤c)包括分离，以及任选地纯化，该表达的IFNa5蛋白质。在一个特定的具体实施方式中，在裂解产生IFNa5的大肠杆菌宿主细胞后，分离包涵体形式(IB)的IFNa5蛋白质，通过将所述IB进行增溶来形成包含变性IFNa5的混合物，之后进行氧化复性处理来形成包含复性的IFNa5的混合物，随后进行纯化过程以获得相应的纯化的IFNa5。在一个特定的具体实施方式中，所述IFNa5是，优选为hIFNa5。

[0082] 为了分离和纯化根据本发明的方法表达的IFNa5，首先裂解产生IFNa5的大肠杆菌宿主细胞，以分离包涵体形式(IB)的所述重组IFNa5。简言之，在一个特定的具体实施方式中，产生IFNa5的大肠杆菌宿主细胞的细胞膜通过使用传统方法，例如均质化，超声处理，或压力循环等来进行裂解。优选的方法包括超声处理或使用Poter's均质器(特氟隆

/ 玻璃）的均质化处理。在细胞被裂解之后，从裂解物的液相中分离包含 IFNa5 的 IB，例如通过离心，以及再悬浮在适当的缓冲溶液中。IB 可任选地通过洗涤来移除其中任何的水溶性的大肠杆菌蛋白质。

[0083] 之后，所述 IB 在存在增溶剂的情况下溶解，所述增溶剂例如促溶剂，如，蛋白变性剂，其分解氢键并影响蛋白质的三级和二级结构，引起蛋白质的展开，溶解一般在水缓冲溶液中进行，以产生包含变性 IFNa5 的混合物。说明性的、非限定的促溶剂的例子包括尿素和盐酸胍 (GdmHCl)，优选盐酸胍，一种强的促溶剂，其抑制多肽链的甲氨酰化作用（该作用在使用浓缩尿素溶液时可能发生）。促溶剂的浓度将依赖于特定的使用的促溶剂和微孔材料的数量。优选的盐酸胍溶液浓度为 6-7M，最优选使用 6M。pH 可通过添加适当的缓冲液进行调节，并且，优选地，pH 将高于 7，一般地，等于或高于大约 8，优选地，等于或高于 8.6，更优选地，在 9.55 和 9.65 之间，包含促溶剂。通常，在一个优选的具体实施方式中，IB 溶解作用是在与再折叠步骤中相同的 pH 下进行的，因此避免了再折叠步骤中另外调节溶解 pH。

[0084] 在溶解包含 IFNa5 的 IB 之后，分离不溶微粒物并弃去。出现在包含变性 IFNa5 的混合物中的变性 IFNa5 通过在复性溶液例如复性缓冲液中稀释所述混合物来进行复性。在一个特定的具体实施方式中，所述复性缓冲液包含活化试剂（例如，L- 精氨酸等），氧化还原对（例如，GSH/GSSG 等），以及，任选的，螯合化合物，在 pH 高于 7.0 的缓冲体系中，一般地，等于或高于大约 8，优选的，等于或高于 8.6，更优选的，在 9.55 和 9.65 之间。在复性之后，包含正确折叠的 IFNa5 的得到的蛋白质溶液通过常规方法澄清，例如，离心或过滤，以除去任意剩余的微粒物。然后，如有必要，该澄清蛋白质溶液的 pH 用合适的酸（例如，HCl）调节到 8.0-8.20，包含复性 IFNa5 的混合物（蛋白质溶液）随后可以用任意合适的方法来纯化 IFNa5。

[0085] 虽然实际上可以使用任意的 IFNa5 的纯化方法，本发明进一步提供了一种纯化 IFNa5 的有效的方法，其包括将复性 IFNa5 进行一个 4 步的色谱方法，包括：

[0086] 1）将包含复性的 IFNa5 的所述混合物进行疏水作用层析；

[0087] 2）将步骤 1）中获得的溶液进行阴离子交换色谱；

[0088] 3）将步骤 2）获得的溶液进行第一阳离子交换色谱；以及

[0089] 4)将步骤 3)获得的溶液进行第二阳离子交换色谱，其中所述溶液，任选地，用包含甲硫氨酸的缓冲液稀释。

[0090] 简言之，将在氧化复性处理之后的包含蛋白质池的 pH 调节、澄清的蛋白质溶液，在步骤 1)中，上样于苯基琼脂糖柱中以将复性的 IFNa5 与其它的成分分离，例如，残留的促溶剂等。另外，使用吸附剂的疏水性表面接触复性的 IFNa5，其更有利于 IFNa5 的成熟。

[0091] 然后，在步骤 2）中，对在步骤 1）中获得的蛋白质池调节电导率（例如，13.00-14.00mS/cm），并且调节 pH 到 8.75-8.85，然后上样于 Q- 琼脂糖（阴离子交换色谱）从而将 IFNa5 单体与其聚集形式分离。具有特定纯度的组分（例如等于或高于 55%）可以收集来进行进一步的纯化。

[0092] 随后，在步骤 3）中，调节步骤 2）中获得的蛋白质池的电导率（例如，6.00-7.00mS/cm），并且将 pH 调节为 5.15-5.20，然后将其上样于 SP- 琼脂糖柱（第一阳离子交换色谱）以将主要的 IFNa5 形式与带电荷的异构体例如 N- 甲硫氨酰基 IFNa5 和乙酰化 IFNa5（其是翻译后修饰产物的形式）分离。具有特定的纯度（例如，等于或高于 70%）的部分可以收集来进

行进一步的提纯。

[0093] 最后，在步骤 4）中，调节在步骤 3）获得的蛋白质池的电导率（例如，6.00-7.00mS/cm），并将 pH 调节至 5.00-5.20，然后上样于第二 SP- 琼脂糖柱（第二阳离子交换色谱）来将主要的 IFNa5 形式与带电荷的异构体分离。在一个具特定的体实施方式中，在上样溶液中添加 L- 甲硫氨酸以避免在室温下进行色谱的过程中 IFNa5 的氧化。以这种方式收集组分，可实现 IFNa5 纯度等于或高于（>）95%（由 RP HPLC 确定）。

[0094] 如果需要，这样获得的 IFNa5 可用药学上可接受的介质和赋形剂，例如，磷酸钠，pH 6.80-7.20，包含氯化钠，来进行配制。如果需要，蛋白质溶液可以浓缩到需要的浓度，例如，在一个特定的具体实施方式中，蛋白质溶液浓缩到了 10mg/mL，例如，到 1.0-1.5mg/mL 蛋白质浓度，使用超滤法进行缓冲液更换，通过最大孔径 0.22μm 的无菌过滤器来进行无菌过滤从而达到灭菌的效果。

[0095] 实施例 3 公开了从产生 hIFNa5 的菌株中分离纯化 hIFNa5 的方法。

[0096] 以下的实施例用于进一步解释本发明的具体实施方式。

[0097] 实施例 1

[0098] 表达 IFNa5 的大肠杆菌菌株的构建

[0099] 本实施例公开了生产重组人干扰素 α-5(hIFNa5) 的大肠杆菌菌株的开发和构建。简言之，hIFNa5 基因的克隆和表达以及生产重组 IFNa5 蛋白质的菌株的构建按照如下所述的方法步骤来完成：克隆编码 hIFNa5 的 cDNA 基因，修饰所述基因的 DNA 序列以优化其在大肠杆菌中的表达，构建表达质粒，将选出的质粒转化入合适的大肠杆菌菌株，以及选择表达 / 诱导条件。

[0100] 方法

[0101] 使用常规方法和步骤来克隆和表达 hIFNa5[Sambrook 等 Molecular cloning :A Laboratory Manual.Second ed.,CSH Laboratory,Cold Spring Harbor,1989 ;Current Protocols in Molecular Biology,vol.1-3(Ausubel F.M. 等，ed.)John Wiley & Sons,Inc.,Brooklyn,New York,1994-1998]。

[0102] 使用酶，DNA 和蛋白质标记的所有操作按照厂商说明书来进行 [主要是 Fermentas(Lithuania)]。

[0103] 遗传构建

[0104] 产生 hIFNa5 的大肠杆菌的构建按照如图 1 所示的遗传构建的过程的流程图的步骤进行。

[0105] 初始质粒

[0106] hIFNa5 编码序列（无信号肽）是从匿名的接受了非肝脏病理的腹部外科手术的捐赠者病人（在征得其同意后）的正常的肝脏组织中克隆的，方法如下：正常的肝脏组织在 1mL 的 Ultraspec 溶液 (Biotex) 中匀浆，使用脱氧核糖核酸酶（Gibco-BRL,Paisley,U.K）处理总 RNA，之后用 M-MLV 逆转录酶（Gibco-BRL）在 RnaseOUT (Gibco-BRL) 存在的条件下进行反转录。hIFNa5 编码序列（无信号肽）通过之前获得的互补 DNA(cDNA) 来进行 PCR 扩增，使用以下的上游和下游引物 (5'-3')：

[0107] GGAATTCCATATG **TGTGATCTGCCTCAGACCCA** (SEQ ID NO :2)，和

[0108] CGGGATCC **TTGAACCAGTTTTCATTCCTTC** (SEQ ID NO :3)。

[0109] 两条引物都包含 hIFNa5 序列(粗体标记)以及特定的限制性内切酶序列 :NdeI 和 BamHI (下划线标记)。PCR 产物使用琼脂糖凝胶电泳分析,将条带从凝胶上切下,使用 Gene Clean 试剂盒 (MP Biomedicals) 来进行纯化。用 TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitogen) 来将纯化的 PCR 产物克隆到 pCR2.1TOPO 质粒中。插入序列的克隆在使用染料若丹明终止子循环测序试剂盒 (Perkin Elmer) 的 ABIPRISM 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer) 上进行测序,以验证插入的确实是 hIFNa5 序列。之后,用 NdeI 和 BamHI 限制性内切酶消化 pCR 2.1TOPO-IFNα5,将 534pb 的条带 (对应于 IFNa5 编码序列) 克隆到已用相同的酶消化的 pET28b 载体(Novagen) 中。该序列通过使用相同的步骤进行再次确认。

[0110] 来自不同菌落的初始质粒 DNA pET28-IFN α-5 使用限制性内切酶酶切分析进行分析(图 2)。

[0111] 质粒 pET28-IFN α-5 通过使用 ABI Prism 377 测序仪来对 DNA 双链进行测序分析。该分析证实了 hIFNa5 的编码序列。质粒 pET28-IFN α-5 用作具有密码子优化的成熟构建体的构建中的 PCR 扩增的模板。

[0112] 具有密码子优化的成熟结构

[0113] 包含密码子优化的的 hIFNa5 的编码基因的 PCR 扩增

[0114] PCR 扩增通过使用质粒 pET28-IFN α-5 作为模板来进行。合成以下的寡聚核苷酸 :

[0115] 正义引物 (SP):5'-CAT ATG TGT GAT CTG CCG CAG ACCCAC TCC CTG TCT AAC CGT CGT ACT CTG ATG ATC ATG GCACAG ATG GGT CGT ATC TCT CCT TTC[SEQ ID NO:4]

[0116] 反义引物 (ASP):5'-CTG CAG TTA TTC CTT ACG ACG TAAACG TTC TTG CAA G[SEQ ID NO:5]

[0117] SP[SEQ ID NO:4] 和 ASP[SEQ ID NO:5] 引物已用于置换大肠杆菌中使用频率最少的密码子,密码子优化主要涉及精氨酸密码子 AGA 和 AGG。

[0118] 克隆 PCR 片段至中间质粒

[0119] 使用 Rapid DNA 连接试剂盒 (#_K1421,Fermentas Lithuania),将纯化的大约 500bp 的扩增产物克隆至 pUC57/T 质粒 (#_SD0171 Fermentas,Lithuania) 中,并且转化入大肠杆菌 JM109(ATCC 53323,ATCC Bacteria and Bacteriophages,19th edition,1996)。通过限制性内切酶酶切分析选择重组的克隆(图 3)。选择了两个克隆,并且将提取的质粒进行了测序。

[0120] 中间质粒 IFNα-5 的序列分析和人 IFNα-5 编码序列再克隆至质粒 pET21b(+)

[0121] 核苷酸序列分析证实了 hIFNa5 编码部分的序列,如图 4 所示。

[0122] hIFNa5 编码片段用 NdeI+BamHI 酶切,将纯化的 DNA 片段连入 NdeI+BamHI 酶切载体 pET21b(+)(Novagen) 来形成质粒 pET21-IFN α-5。在转化入大肠杆菌 JM109 菌株之后,通过添加 100μg/mL 的氨苄青霉素来筛选细菌。转化细胞获得的菌落的重组插入分析用菌落 PCR 测试方法来进行。详细的质粒 pET21-IFNα-5 的限制性内切酶酶切分析,PCR 阳性的克隆的纯化,都获得了预期的限制性酶切图谱(图 5)。

[0123] 重组 hIFNa5 的表达

[0124] 在非表达的宿主中建立质粒 pET21-IFN α-5 (稳定的) 之后,将其转化到具有用于表达目标蛋白质的相关遗传元件的宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 中,从而形成了大肠杆菌

BL21(DE3)pET21-IFN a-5 菌株。hIFNa5 的表达用 1mM IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)进行诱导,结果如图 6 所示。

[0125] 根据 SDS-PAGE,hIFNa5 的分子量在大约 20kDa 处,其对应于计算的 19.7kDa 的大小。

[0126] 在总的细胞裂解物的不溶部分中检测重组 hIFNa5;目标蛋白质的得率为总细胞蛋白质的大约 20%。hIFNa5 包括了接近 40% 的细胞裂解物的不溶部分。获得的表达菌株的一个菌落用于建立研究原始细胞库 (RMCB)。

[0127] 实施例 2

[0128] 通过生产菌株的 hIFNa5 的生物合成方法

[0129] 大肠杆菌 BL21(DE3)pET21-IFN α-5 菌株(实施例 1)在培养基中培养,所述培养基具有以下组分(g/L):

[0130] a)在烧瓶中的接种物制备(培养)(g/L):磷酸氢二钠 (17.0),磷酸二氢钾 (1.82),硫酸铵 (3.0),七水合硫酸镁 (0.5),D(+)-水合葡萄糖 (15.0) 和微量元素原液 e) (0.16mL);

[0131] b)用于发酵 (g/L):磷酸氢二铵 (4.0),七水合硫酸镁 (0.5),磷酸二氢钾 (13.3),柠檬酸一水合物 (1.6),D(+)-水合葡萄糖 (30.0) 和微量元素原液 e)(0.25mL);

[0132] c)料液 A(g/L):D(+)-水合葡萄糖 (700.0),七水合硫酸镁 (20.7) 和微量元素原液 e)(3.4mL/L);

[0133] d)料液 B(g/L):磷酸氢二铵 (360.0) 和磷酸二氢钾 (306.7);以及

[0134] e)微量元素(痕量元素)原液 (g/L):六水合氯化铁 (III)(30.0),二水合氯化钙 (4.05),七水合硫酸锌 (II)(6.75),一水合硫酸锰 (II)(1.5),五水合硫酸铜 (II)(3.0),六水合氯化钴 (II)(1.14),二水合钼酸钠 (0.3) 和硼酸 (0.69)。

[0135] 图 7 示出了人 IFN α-5 生物合成方法完整的方案。

[0136] 接种物制备:锥形瓶包含 500mL 无菌的培养基,以在烧瓶 [a)] 中进行培养,在锥形瓶中接种 0.25mL 储用培养的 WCB (工作细胞库) 大肠杆菌 BL21(DE3)pET21-IFN α-5。随后,将烧瓶在旋转振荡器中培养,振荡速度为 300rpm,30℃的温度下培养 21-22 小时。培养之后的光密度必须等于或高于 4.50o.u. (光学单位) [λ=595nm]。

[0137] 发酵:发酵罐(总体积 13.7L),包含 7.0L 的发酵培养基 [b)],接种 1.5%-1.6% 的在接种物烧瓶中获得的培养物。发酵在自动控制的温度 (37℃)、pH(6.8) 和 pO_2(20%) 的条件下进行。25% 铵溶液用于 pH 的校正。在 8-9 小时培养后,开始补料。料液 A[c)] 以一定的剂量泵入以保持培养基中葡萄糖的浓度在大约 3g/L 和 22g/L 之间。使用 IPTG 在 90-110 o.u.(λ=595nm) 进行诱导到最终的 IPTG 浓度为 0.5mM。在诱导点的特定的培养物生长率应不低于 0.45 以使得在诱导之后有足够的比生长速率。在诱导之后的平均特定培养物生长率应当高于 0.17。料液 B[d)] 以单独的剂量泵入:诱导之后在 60-70o.u. 为 150mL,在 120-140o.u 为 150mL,在 1.5 小时 (90 分钟) 为 75mL 和在 2 小时为 75mL。在诱导之后在相同的条件下继续发酵 3 小时。然后细胞悬液在发酵罐中 12-15℃下冷却,并且通过蠕动泵 (35L/h) 转移到离心机中。细胞悬液在 4℃以 5,000rpm 的转速进行离心。

[0138] 收获的生物量收集到聚乙烯袋中,放置在 (-33±5)℃冰箱中冷冻之后储存。取出一部份冷冻的生物量来评估总的蛋白质和 hIFNa5 的表达。

[0139] 实施例 3

[0140] 从生产菌株中分离和纯化 hIFNa5 的方法

[0141] 1. 生物量的均质化，裂解和分离包涵体 (IB)

[0142] 在实施例 2 中获得的生物量的 680.0 - 700.0g 在再悬浮缓冲液 (0.1MTris-HCl, pH 7.80-8.00, 2mM EDTA, 0.1%TritonX-100 和 1mM PMSF) 中均质化，比率为 1/10(w/v)，即，1g 湿的生物量 /10mL 再悬浮缓冲液。

[0143] 再悬浮在 Poter's 匀浆器 (特氟隆 / 玻璃) 中进行，随后细胞使用高压匀浆器在 600-800bar, 4-10℃的温度下裂解。在细胞裂解之后，通过在 8,000rpm 离心超过 30-35 分钟来分离包涵体 (IB)。

[0144] 2. 洗涤包涵体 (IB)

[0145] 分离的 IB 的预洗涤通过使用洗涤缓冲液 I-III 的 4 个连续的步骤来进行 :

[0146] 洗涤缓冲液 I :10mM Tris-HCl 缓冲液，pH 7.45-7.55，包含 1M NaCl, 0.1% 聚山梨醇酯 -80 ;

[0147] 洗涤缓冲液 II :10mM Tris-HCl 缓冲液，pH 8.00-8.20，包含 6M 尿素 ;

[0148] 洗涤缓冲液 III :10mM Tris-HCl 缓冲液，pH 8.00-8.20。

[0149] 简言之，IB 的洗涤按照如下步骤进行 :

[0150] a) 最初的两次洗涤 (步骤 1 和 2)，IB 用洗涤缓冲液 I 洗涤 ;

[0151] b) 第三步洗涤 (步骤 3)，IB 用洗涤缓冲液 II 洗涤 ;以及

[0152] c) 第四步洗涤 (步骤 4)，IB 用洗涤缓冲液 III 洗涤。

[0153] 在整个 IB 的洗涤过程中，保持洗涤缓冲液 / 湿的生物量的比率为 10ml 缓冲液 /1g 湿的生物量。

[0154] 3. IB 的增溶作用

[0155] 为了溶解 IB，使用增溶缓冲液 (50mM 甘氨酸 /NaOH 缓冲液，pH 9.55-9.65，包含 6M GdmHCl)。溶解比率 : 从 1g 生物量中分离的 IB 在 6mL 增溶缓冲液中在 2-8℃溶解 2 小时，随后 8,000rpm 离心 25-30 分钟。

[0156] 4. 复性

[0157] 复性缓冲液 :50mM 甘氨酸 /NaOH 缓冲液，pH 9.55-9.65，包含 1.2MNaCl, 0.22M L- 精氨酸，2.85mM GSH, 0.285mM GSSG，电导率在 4-10℃为 110-110mS/cm。

[0158] GdmHCl- 变性人 IFNα5 的复性通过滴加 IB 增溶液到复性缓冲液中 (体积比 1 : 7) 到达到复性混合物中 0.2M L- 精氨酸，2.5/0.25mM GSH/GSSG 的终浓度。复性混合物在 2-8℃持续搅拌 44-66 小时。在复性之后，蛋白质溶液通过 8,000rpm 离心 30-35 分钟来澄清。

[0159] 5. 色谱法

[0160] hIFNa5 的纯化通过如下所示的四步色谱方法来进行。

[0161] 5.1 苯基琼脂糖柱 (疏水作用层析) 的色谱法

[0162] 使用苯基琼脂糖柱将复性的 hIFNa5 与残余的促溶剂 GdmHCl 分离。另外，将复性的 hIFNa5 与吸附剂的疏水性表面接触有利于 hIFNa5 的成熟。

[0163] 简言之，澄清蛋白质溶液的 pH 用 6M HCl 调节至 8.00-8.20，然后将蛋白质溶液上样于苯基琼脂糖色谱柱，使用如下方法参数 :

[0164] 色谱介质：苯基－琼脂糖凝胶 FF(Amersham Pharmacia Biotech AB)；

[0165] 使用的柱子：BPG 100×500mm，直径 10cm；

[0166] 线性流速：60cm/ 小时；

[0167] 色谱介质柱床体积：2.7±0.3L

[0168] 平衡缓冲液：20mM Tris-HCl 缓冲液，pH 8.00-8.20，包含 1.5M 氯化钠，15-25℃电导率 115-125mS/cm（4-10℃为 110-120mS/cm）：

[0169] 洗脱缓冲液：10mM Tris-HCl 缓冲液，pH 9.20-9.25，15-25℃电导率 0.1-0.2mS/cm；

[0170] 洗脱：用超过 6 个柱体积 (CV)[即，6CV] 洗脱缓冲液进行洗脱。收集蛋白质溶液 2-6CV。

[0171] 5.2Q- 琼脂糖柱色谱法(阴离子交换色谱)

[0172] Q- 琼脂糖柱用于将 hIFNa5 单体与其聚集形式分离。

[0173] 简言之，在之前的步骤 (5.1) 中获得的蛋白质池通过添加包含 5MNaCl 的 20mM Tris-HCl，pH 8.75-8.85 的缓冲液来调节电导率到 13.00-14.00mS/cm，并且用 6M HCl 将 pH 调节至 8.75-8.85。蛋白质溶液随后上样于 Q- 琼脂糖色谱柱，使用以下的参数：

[0174] 色谱介质：Q- 琼脂糖凝胶 FF(Amersham Pharmacia Biotech AB)；

[0175] 使用的柱子：BPG 140×500MM，直径 14cm；

[0176] 线性流速：60cm/ 小时；

[0177] 色谱介质柱床体积：3.3±0.3L

[0178] 平衡缓冲液：包含 0.12M 氯化钠的 20mM Tris-HCl 缓冲液，pH8.75-8.85，15-25℃电导率 13.00-14.00mS/cm；

[0179] 洗脱缓冲液：包含 0.23mM 氯化钠的 20mM Tris-HCl 缓冲液，pH8.75-8.85，15-25℃电导率 23.00-25.00mS/cm；

[0180] 洗脱：使用超过 5 倍柱体积 (5CV) 线性梯度到 100% 洗脱缓冲液和 5CV100% 洗脱缓冲液。

[0181] 组分体积是 400-1,000mL。

[0182] 只有纯度(由 RP-HPLC 确定)等于或高于（≥）55% 的 hIFNa5 组分收集进行进一步纯化。

[0183] 5.3SP- 琼脂糖柱第一色谱法(阳离子交换色谱 I)

[0184] SP- 琼脂糖柱用于第三和第四色谱法步骤，以将主要的 hIFNa5 形式与电荷异构体例如 N- 甲硫氨酰基 hIFNa5 和乙酰化 hIFNa5（其是翻译后修饰产物的形式）分离。

[0185] 简言之，在之前的步骤 (5.2) 中获得的蛋白质池通过添加 10mM 乙酸钠缓冲液，pH4.95-5.05 将电导率调节到 6.00-7.00mS/cm，pH 用 4M 乙酸调节到 5.15-5.20。蛋白质溶液随后上样于色谱法的 SP- 琼脂糖柱，使用以下参数：

[0186] 色谱介质：SP- 琼脂糖凝胶 FF(Amersham Pharmacia Biotech AB)；

[0187] 使用的柱子：BPG 100×500mm，直径 10cm；

[0188] 线性流速：60cm/ 小时；

[0189] 色谱介质柱床体积：3.3±0.3L

[0190] 平衡缓冲液：包含 50mM 氯化钠的 20mM 乙酸钠缓冲液，pH5.15-5.20，15-25℃电导

率 6.00-7.00mS/cm ;

[0191] 洗脱缓冲液:包含 2mM/L- 甲硫氨酸和 0.1M NaCl 的 20mM 乙酸钠缓冲液,pH 5.15-5.20,15-25℃电导率 11.00-13.00mS/cm ;

[0192] 洗脱:用超过 10 倍柱体积 (10CV) 洗脱缓冲液进行洗脱。

[0193] 组分体积为 400-2,000mL。

[0194] 只有等于或高于 (>)70% 纯度的 hIFNa5 (由 RP-HPLC 确定)的组分收集以进行进一步的纯化。

[0195] 5.4SP- 琼脂糖凝胶柱第二色谱法(阳离子交换色谱 II)

[0196] 简言之,上样溶液 [从第一 SP- 琼脂糖柱 (步骤 5.3) 中回收的蛋白质组分] 用包含 2mM/L- 甲硫氨酸的 5mM 乙酸钠缓冲液,pH 5.00-5.20,进行稀释,在 15-25℃的电导率 0.200-0.800mS/cm 到 15-25℃的电导率 6.00-7.00mS/cm。上样溶液中加入 2mM/L- 甲硫氨酸是为了防止在室温下进行色谱的过程中 hIFNa5 的氧化。上样溶液上样于 SP- 琼脂糖色谱柱,使用以下的参数 :

[0197] 色谱介质:SP- 琼脂糖凝胶 FF(Amersham Pharmacia Biotech AB) ;

[0198] 使用的柱子:BPG 100×500mm,直径 10cm ;

[0199] 线性流速:60cm/ 小时 ;

[0200] 色谱介质柱床体积:3.0±0.3L

[0201] 平衡缓冲液:包含 50mM 氯化钠的 20mM 乙酸钠缓冲液,pH5.15-5.20,15-25℃电导率 6.00-7.00mS/cm ;

[0202] 洗脱缓冲液:包含 0.1M NaCl 的 20mM 乙酸钠缓冲液,pH 5.15-5.20,15-25℃电导率 11.00-13.00mS/cm ;

[0203] 洗脱线性流速 :45cm/ 小时 ;

[0204] 洗脱 : 用超过 20 倍柱体积 (20CV) 的线性梯度到 100% 洗脱缓冲液。

[0205] 组分体积是 400-2,000mL。

[0206] 收集通过 RP-HPLC 确定的等于或高于 (>)95% 纯度的 hIFNa5 组分。

[0207] 配制、浓缩、无菌过滤

[0208] 配制缓冲液 :包含 0.1M 氯化钠的 25mM 磷酸钠,pH 6.80-7.20,15-25℃电导率 10.00-14.00mS/cm。

[0209] 缓冲液更换 / 蛋白质溶液浓缩通过透滤法 / 浓缩通过等于或高于 (≥)1.00mg/mL 的 Biomax 10kDa 膜来进行,无菌过滤通过无菌的 0.22μm 过滤器 (Millipak 20) 来进行,并装入玻璃管中。

[0210] 图 8 示出了在重组 hIFNa5 蛋白质的还原以及非还原的条件下,通过 SDS-PAGE(14%) 测得的,根据本发明的方法和配方获得的三个大规模纯化批次中重组 hIFNa5 的纯度。

[0211] 图 9 示出了通过“反相 - 高效液相色谱”(RP-HPLC) 测得的,根据本发明的方法和配方获得的重组 hIFNa5 的纯度(该图示出了三个大规模批次的重组 hIFNa5 的结果)。

[0212] 图 10 示出了通过“分子筛 -HPLC”(SE-HPLC) 测得的,根据本发明的方法和配方获得的 3 个重组 hIFNa5 大规模批次的重组 hIFNa5 的纯度。

[0213] 图 11 示出了通过等电点聚焦分析测得的,根据本发明的方法和配方获得的三

个大规模批次的重组 hIFNa5 的重组 hIFNa5 的纯度。泳道 1,11 :pI 标准样品 (Amersham Pharmacia) ;泳道 2,3,4 :重组 hIFNa5,15μg ;泳道 5,6,7 :重组 hIFNa5,5μg ;泳道 8,9,10 :重组 hIFNa5,1μg。

[0214] 图 12 示出了根据本发明纯化和制备的 3 个大规模的重组 hIFNa5 制剂批次的肽图色谱。

[0215] 实施例 4

[0216] 微量元素和葡萄糖浓度对重组人 IFNα-5 的生物合成的影响的评估

[0217] 本实施例的目的实施为了证实在重组人 IFNα-5(hIFNa5) 的翻译后修饰中微量元素的影响,来确定在碳料液中关键微量元素浓度的限度,以及评估在重组 hIFNa5 的生物合成中葡萄糖浓度的影响。因此本实施例描述了在研究中进行的分析以及获得的结果,来论证碳料液中的微量元素浓度和论证重组 hIFNa5 的生物合成方法中的葡萄糖浓度。

[0218] 在优化 hIFNa5 生物合成方法的过程中,发现了发酵培养基中金属或微量元素(痕量元素)的浓度对于 hIFNa5 蛋白质的翻译后修饰有影响。因此,本研究的目的是确认所述的痕量元素在 hIFNa5 蛋白质翻译后修饰的影响,以及确定在碳料液中关键微量元素浓度的限度。除此之外,还决定评估在提供了每个碳补料剂量后的发酵培养基中葡萄糖浓度 (17g/L 和 22g/L),以确定其是否对培养物生长具有影响 (即,其是否参与培养物生长限制,影响生物量得率,或者其是否对培养物生长没有影响),以及是否对目标蛋白质(重组 hIFNa5)的质量有影响。

[0219] 材料和方法

[0220] 本实验的计划根据“实验设计”(DOE) 来进行设计和监控,其在表 1 中示出。

[0221] 表 1

[0222] 设计和进行的实验

[0223]

短批次号	碳料液中微量元素的浓度， mL/L	在发酵培养基中葡萄糖浓度的上限，g/L
M-83	2.2	17
M-84	2.2	22
M-85	2.7	17
M-86	2.7	22
M-87	3.7	17
M-88	3.7	22
M-89	4.2	17
M-90	4.2	22
M-92	3.2	22
M-80*;	3.0	22
M-82*	3.4	22
F-00308	4.0	22

[0224] 包括实验 (*)，该实验在之前相同的条件下已经进行过。

[0225] 在化学定义的无机盐 / 葡萄糖培养基中进行了高细胞密度分批补料发酵。

[0226] 用于烧瓶培养的无机盐 / 葡萄糖培养基的成分 (g/L)：磷酸氢二钠 -17.0，磷酸二氢钾 -1.82，硫酸铵 -3.0，七水合硫酸镁 -0.5，一水合 D(+)- 葡萄糖 -15.0，微量元素原液 -0.16mL。

[0227] 微量元素（痕量元素或金属）原液 (g/L)：六水合氯化铁 (III)，二水合氯化钙 -4.05，七水合硫酸锌 (II)-6.75，一水合硫酸锰 (II)-1.5，五水合硫酸铜 (II)-3.0，六水合氯化钴 (II)-1.14，二水合钼酸钠 -0.3，硼酸 -0.69。

[0228] 用于发酵的无机盐 / 葡萄糖培养基成分 (g/L)：磷酸氢二铵 -4.0，七水合硫酸镁 0.5，磷酸二氢钾 -13.3，一水合柠檬酸 -1.6，D(+)- 一水合葡萄糖 -30.0，微量元素原液 -0.25mL。

[0229] 碳料液：70.0% 葡萄糖，2.1%MgSO4x7H2O 和根据实验计划的微量元素原液。

[0230] 从第 8 小时的培养时间开始每 (15-30) 分钟测量葡萄糖浓度，并且之后添加计算好的碳料液（达到根据实验计划的葡萄糖浓度上限 17g/L 或 22g/L）。

[0231] 另外，70mL 的两种磷酸溶液（磷酸氢二铵 -25.0g，磷酸二氢钾 -21.0g 分成 3 个剂量 ：比例 2:2:1 或 28:28:14mL）以单独的剂量在 60-75，120-135 和 170-180 o.u 时添加。

[0232] 如果需要的话，自动进入富含纯氧空气（直到每升总发酵罐体积的 60%）来维持溶氧浓度在 20%。

[0233] 来自 WCB（存储于 -70° C）[实施例 2] 的大肠杆菌 BL21(DE3)pET21-IFN a-5 的 0.25ml 的存储培养物在 500mL 无机盐 / 葡萄糖培养基（pH 大约 7.7）中增殖，30° C 下在定

轨振荡器中 (300rpm) 培养 22 小时。

[0234] 接种物是工作发酵罐体积的大约 1.0%(20mL),实际体积的 1.54%。

[0235] 发酵在 3L 总体积 /2L 工作体积发酵罐“Biostat B”中进行,pH 6.8,pO_2-20%,温度 37℃。自动控制发酵方法在线的变量(温度、搅拌、pH、pO_2、酸 / 碱消耗)以及离线的变量 - 光密度在 MFCS/win 图上示出。

[0236] 35% 正磷酸和 25% 氨溶液用于 pH 校正。

[0237] 泡沫用 20% Pluronic®31R1来消除。

[0238] 在 OD 91.6-103.6o.u.(λ=600nm) 时用 IPTG 来进行诱导,直到最终工作体积中 IPTG 终浓度为 0.5mM。发酵持续另外的 3 小时。

[0239] 特定的培养物生长速率 (μ),输入的(另外的补料)和输出的(取样用于 OD 和葡萄糖的测量) 体积在发酵过程中严格地计算。

[0240] 结果和数据分析

[0241] 在研究中进行的分析和获得的结果证实了在大肠杆菌中产生重组 hIFNa5 蛋白质的翻译后修饰依赖于培养基中微量元素的浓度。

[0242] 在微量元素(原液)的浓度等于或高于 3.0mL/L 碳料液或等于或高于 0.95mL/L 实际最终悬浮液体积,并且诱导后的特定的培养生长率的平均值等于或高于 (≥)0.17(表 2-3) 时,氧化甲硫氨酸 hIFNa5 相关蛋白质会被清除。

[0243]

表 2

碳料液中不同浓度微量元素下的生物合成参数

短批次号	烧瓶 OD (600 nm)	微量元素原液. (mL/L 碳料液)	葡萄糖上限 (g/L)	发酵					总蛋白质 (mg/g 生物量)	总蛋白质中 hIFNa5 的表达 (%)
				诱导之前经过的时间 (小时)	OD (600 nm)		WCW (g/L)	DCW (%)		
					诱导时	发酵结束				
M-83	5.1	2.2	17	11.25	94.6	136.2	169.1	30.12	115.00	18.95
M-84	4.9	2.2	22	11.25	91.8	139.2	161.4	31.89	98.33	18.95
M-85	5.6	2.7	17	11.75	95.8	149.3	158.5	30.98	101.33	17.95
M-86	5.4	2.7	22	11.50	91.6	147.0	170.7	30.26	113.33	17.35
M-80	5.3	3.0	22	11.75	103.6*	180.6*	175.4	32.11	120.33	18.53
M-81	5.2	3.0	22	11.00	96.8*	184.0*	185.9	33.47	122.20	18.47
M-92	4.8	3.2	22	11.50	103.6	172.5	188.3	30.31	112.00	20.00
M-82	5.5	3.4	22	11.50	99.5*	184.6*	178.8	32.08	116.00	18.13
M-87	4.5	3.7	17	11.75	99.6	179.0	183.4	30.82	114.33	18.75
M-88	5.0	3.7	22	11.75	96.0	158.5	175.3	30.49	116.33	18.40
M-89	4.8	4.2	17	13.00	92.4	173.5	182.4	31.09	126.70	21.45
M-90	4.5	4.2	22	11.75	98.8	178.0	194.1	30.67	151.00	20.95

* - 在较早进行的批次中用 BioPhotometer (Eppendorf, Á=595 nm)测量的 OD，其它–使用 Spectrometer EZ 150 (PerkinElmer, A=600 nm)测量；WCW: 细胞湿重(g/L 细胞悬液)；DCW：细胞干重(%).

[0244]

表 3

不同浓度的微量元素下生物合成和再折叠的参数

预批次号	μ		微量元素原液(mL/L碳料液)	总微量元素(mL/L/o.u.)(最终)	总微量元素（mL/L最终）（实际最终体积）	hIFNa5 mg/mL 6M GdHCl	RP-HPLC，再折叠之后%			
	诱导时	诱导后平均值					甲硫氨酸 hIFNa5	正确折叠 hIFNa5	乙酰化 hIFNa5	
									峰-1	峰-2
M-83	0.470	0.121	2.2	0.00581	0.790	1.84	12.60	50.35	3.02	4.08
M-84	0.457	0.139	2.2	0.00559	0.778	1.74	14.44	46.67	3.08	**4.15**
M-85	0.350	0.148	2.7	0.00627	0.935	1.95	15.48	41.10	2.93	4.38
M-86	0.427	0.158	2.7	0.00639	0.939	1.85	5.61	52.65	3.33	4.63
M-80	0.563	0.185	3.0	0.00543	0.980	2.52	0	62.01	4.08	5.07
M-81	0.578	0.214	3.0	0.00498	0.950	2.53	0	60.63	4.2	**4.56**
M-92	0.497	0.170	3.2	0.00641	1.105	2.26	0	66.58	4.07	5.45
M-82	0.452	0.194	3.4	0.00591	1.130	2.34	0	59.98	4.53	5.0
M-87	0.433	0.181	3.7	0.00687	1.229	2.02	0	63.04	5.22	5.52
M-88	0.575	**0.163**	3.7	0.00745	1.166	1.78	**1.43****	63.15	2.61	3.47
F-00310811*	0,498	0.180	4.0	NT	NT	NT	0	48.36	7.75	7.11 ***
M-89	0.466	0.21	4.2	0.00787	1.365	1.82	0	54.06	7.23	5.99***
M-90	0.522	0.196	4.2	0.00788	1.403	1.68	0	55.57	7.66	5.94***

* 10 L（工作体积）发酵；** -诱导之后较慢的生长速率(稀释，由于消泡器有故障，加入了 84 mL 的消泡溶液)。 *** -在主要的峰和两个乙酰化形式的峰之间观察到了另外的（未知）形式的形成。NT：未检测。

[0245] 此处公开的，表 2 示出了在碳料液中不同浓度微量元素下的生物合成参数，而表 3 示出了在不同浓度微量元素的下生物合成和再折叠的参数。

[0246] 已经进行了大量的研究，例如 (i) 特定的培养物生长率 (μ) 对于碳料液中或细胞悬浮液中微量元素的浓度的依赖性 ；(ii) 在再折叠之后的氧化甲硫氨酸 hIFNa5(OxidMet hIFNa5) 以及再折叠之后的总的乙酰化 hIFNa5 对于诱导之后的特定的培养物生长率 (μ) 的平均值的依赖性 ；(iii)hIFNa5 蛋白质翻译后修饰 (再折叠之后的 OxidMet hIFNa5，再折叠之后的乙酰化 hIFNa5，再折叠之后正确折叠的 hIFNa5) 对于碳料液中微量元素浓度的依赖性 ；以及 (iv)hIFNa5 相关形式 (再折叠之后的乙酰化 hIFNa5 和再折叠之后的 OxidMet hIFNa5)对于碳料液中或细胞悬液中微量元素的浓度的依赖性。而且，所有的批次在再折叠之后都通过 RP-HPLC 进行检测。从结果中可以明显地看出，特定的培养物生长率 (μ) 和生物量得率依赖于培养基中微量元素的浓度 (表 2-3)。

[0247] 总之，获得的结果显示了 ：

[0248] - 在氧化的甲硫氨酸 hIFNa5 数量最高时观察到了最低量的乙酰化 hIFNa5，反之亦然 (短批次号 ：M-83、M-84、M-85 和 M-86) ；

[0249] - 当微量元素 (愿液) 浓度在 3.0-3.7mL/L 碳料液的范围内时 (短批次号 ：M-80、M-81、M-92、M-82 和 M-87)，或当其在 0.95-1.23mL/L 实际最终悬浮液体积范围内时 (表 3)，乙酰化 hIFNa5 的量大约是 8-11% ；以及

[0250] - 当碳料液中微量元素的浓度高于 4mL/L 或高于 1.23mL/L 实际最终细胞悬液体积时，发现了另外的未知 (未鉴定) 的形式 [在主峰和乙酰化形式的两个峰之后观察到 (数据未示出)]。

[0251] 获得的结果同样示出了葡萄糖浓度的上限 (17g/L 或 22g/L) 实际上不会影响目标蛋白质 (hIFNa5) 的质量以及生物量的得率，实际获得值在误差范围内 (表 2)。

[0252] 结论

[0253] - 在本研究中获得的结果提供了在重组 hIFNa5 的生物合成方法中碳料液中的微量元素浓度以及葡萄糖浓度的合理解释。

[0254] - 当微量元素浓度等于或高于 3.0mL/L 碳料液或高于 0.95mL/L 最终实际悬浮液体积并且在诱导之后特定的培养物生长率 (μ) 等于或高于 0.17 时，氧化甲硫氨酸 hIFNa5 蛋白质被清除。

[0255] - 当微量元素的浓度在大约 3.0 到大约 3.7mL/L 碳料液或大约 0.95 到大约 1.23mL/L 最终实际的悬浮液体积时，乙酰化 hIFNa5 蛋白质为大约 8-11%。

[0256] - 当碳料液中微量元素的浓度高于 3.7mL/L 或高于 1.23mL/L 最终实际悬浮液体积时，合成了未知的 (未鉴定) 蛋白质形式。

[0257] - 决定最大得率和最优质量的目标 hIFNa5 蛋白质的微量元素的最适浓度在大约 3.0 到大约 3.7mL/L 碳料液的范围内。

[0258] - 葡萄糖浓度从 17g/L 到 22g/L 的浓度范围实际上不会影响目标蛋白质 (重组 hIFNa5) 的质量和生物量的得率。

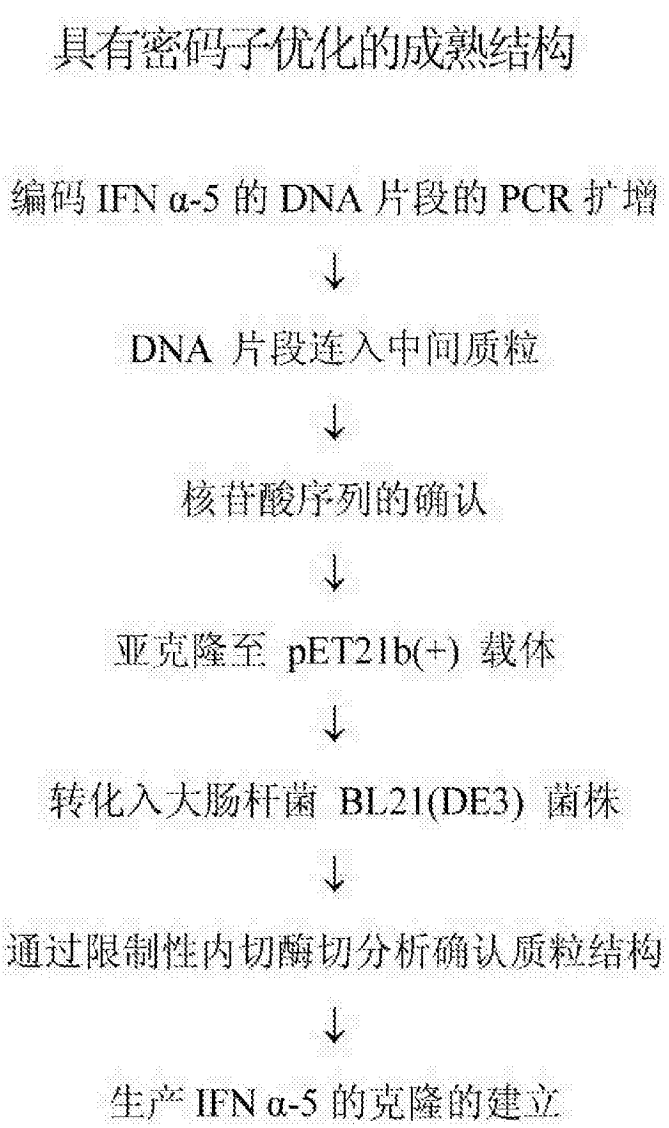
具有密码子优化的成熟结构
编码 IFN α-5 的 DNA 片段的 PCR 扩增
DNA 片段连入中间质粒
核苷酸序列的确认
亚克隆至 pET21b(+) 载体
转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株
通过限制性内切酶切分析确认质粒结构
生产 IFN α-5 的克隆的建立

图 1

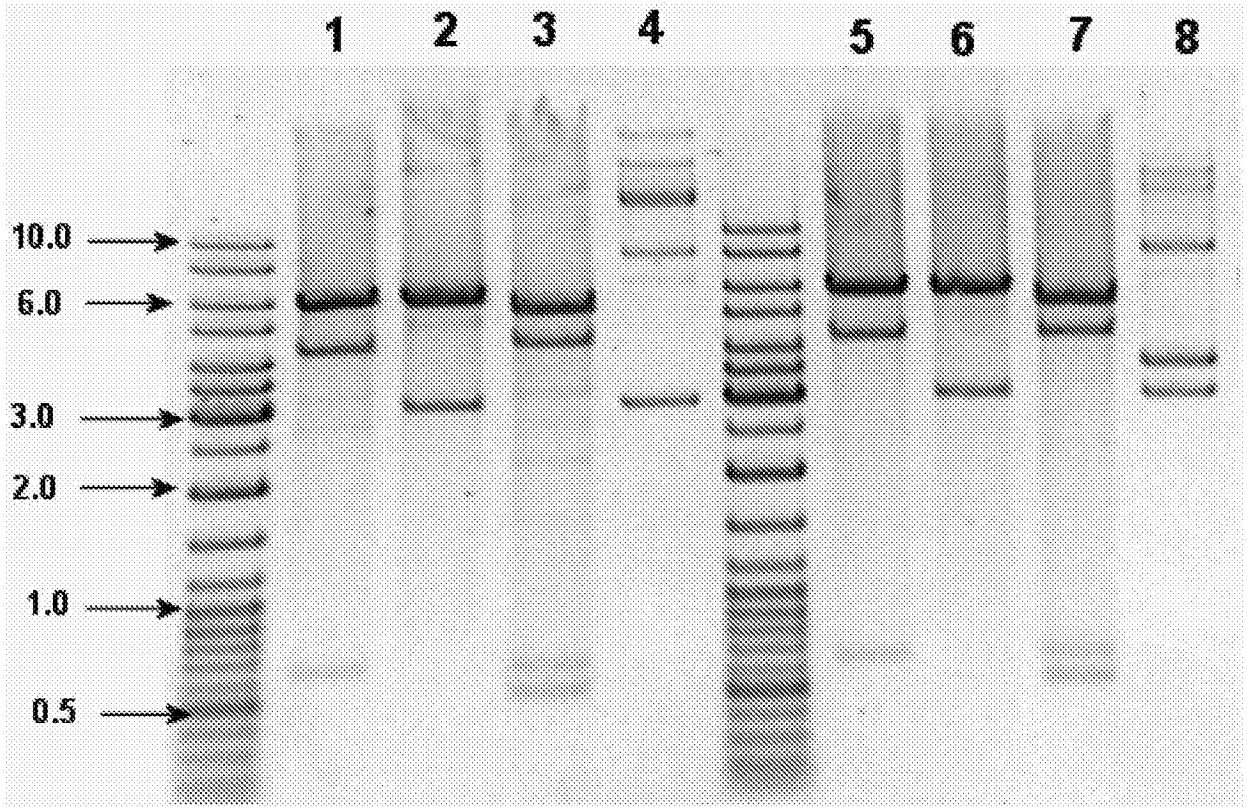

图 2

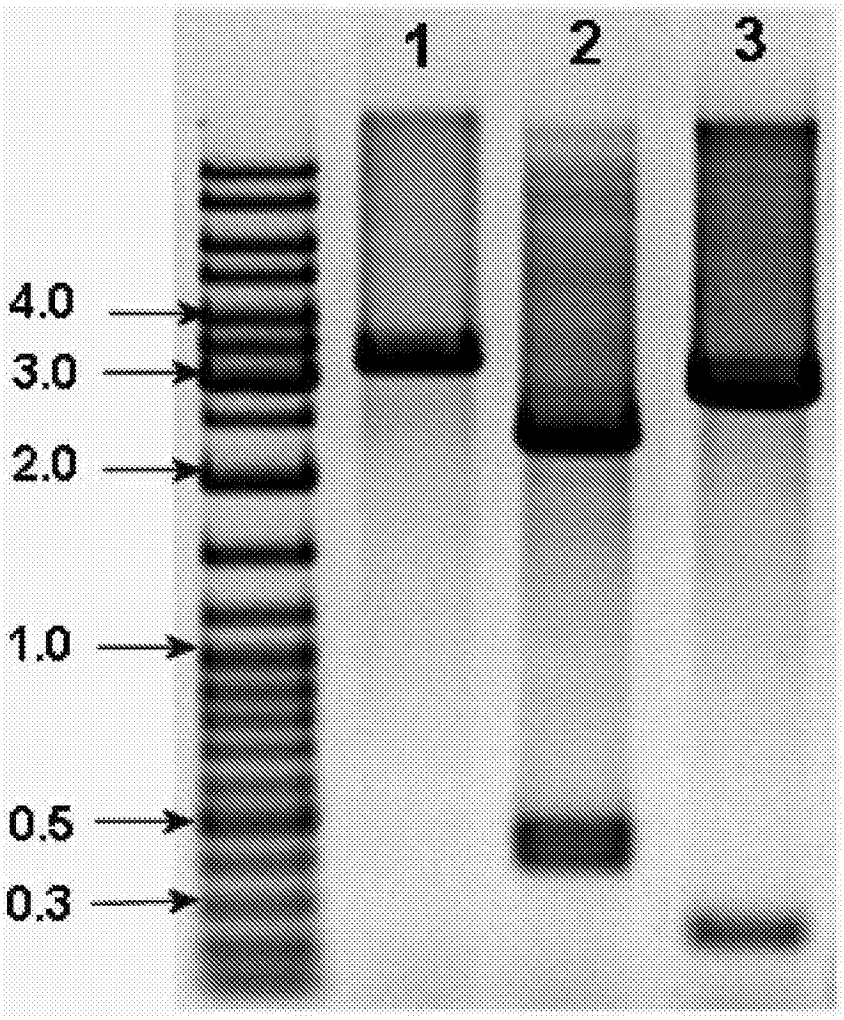

图 3

```
1    atg tgt gat ctg ccg cag acc cac tcc ctg tct aac cgt cgt act ctg atg atc atg gca
       M   C   D   L   P   Q   T   H   S   L   S   N   R   R   T   L   M   I   M   A
61   cag atg ggt cgt atc tct cct ttc tcc tgc ctg aag gac aga cat gac ttt gga ttt cct
       Q   M   G   R   I   S   P   F   S   C   L   K   D   R   H   D   F   G   F   P
121  cag gag gag ttt gat ggc aac cag ttc cag aag gct caa gcc atc tct gtc ctc cat gag
       Q   E   E   F   D   G   N   Q   F   Q   K   A   Q   A   I   S   V   L   H   E
181  atg atc cag cag acc ttc aat ctc ttc agc aca aag gac tca tct gct act tgg gat gag
       M   I   Q   Q   T   F   N   L   F   S   T   K   D   S   S   A   T   W   D   E
241  aca ctt cta gac aaa ttc tac act gaa ctt tac cag cag ctg aat gac ctg gaa gcc tgt
       T   L   L   D   K   F   Y   T   E   L   Y   Q   Q   L   N   D   L   E   A   C
301  atg atg cag gag gtt gga gtg gaa gac act cct ctg atg aat gtg gac tct atc ctg act
       M   M   Q   E   V   G   V   E   D   T   P   L   M   N   V   D   S   I   L   T
361  gtg aga aaa tac ttt caa aga atc act ctc tat ctg aca gag aag aaa tac agc cct tgt
       V   R   K   Y   F   Q   R   I   T   L   Y   L   T   E   K   K   Y   S   P   C
421  gca tgg gag gtt gtc aga gca gaa atc atg aga tcc ttc tct tta tca gca aac ttg caa
       A   W   E   V   V   R   A   E   I   M   R   S   F   S   L   S   A   N   L   Q
481  gaa cgt tta cgt cgt aag gaa taa 504
       E   R   L   R   R   K   E   -
```

图 4

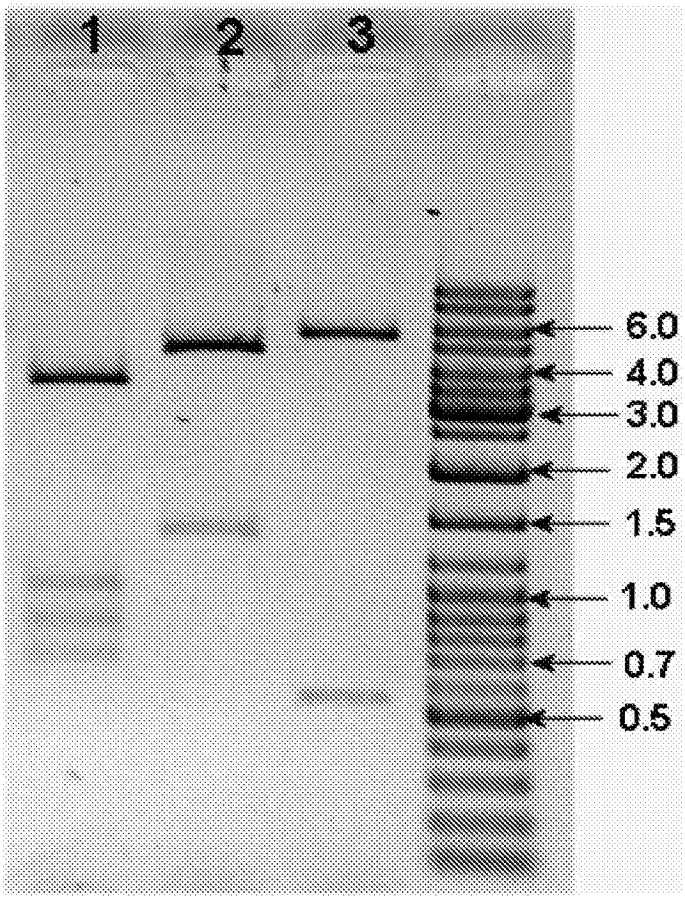

图 5

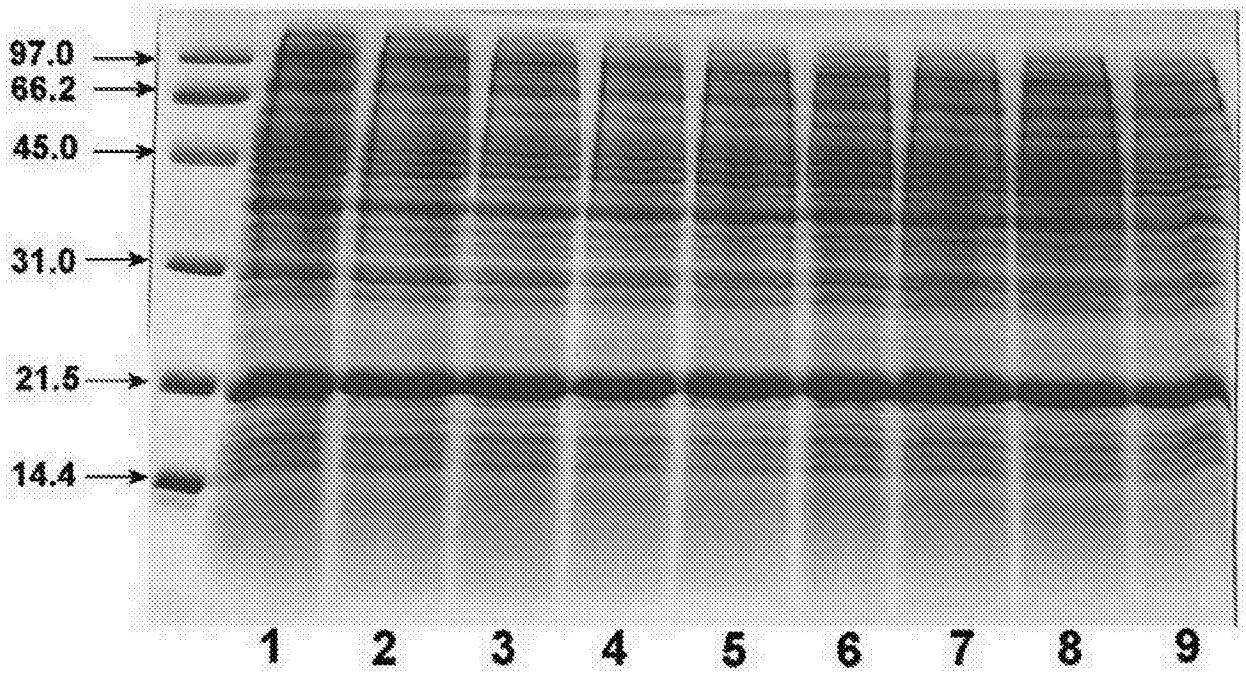

图 6

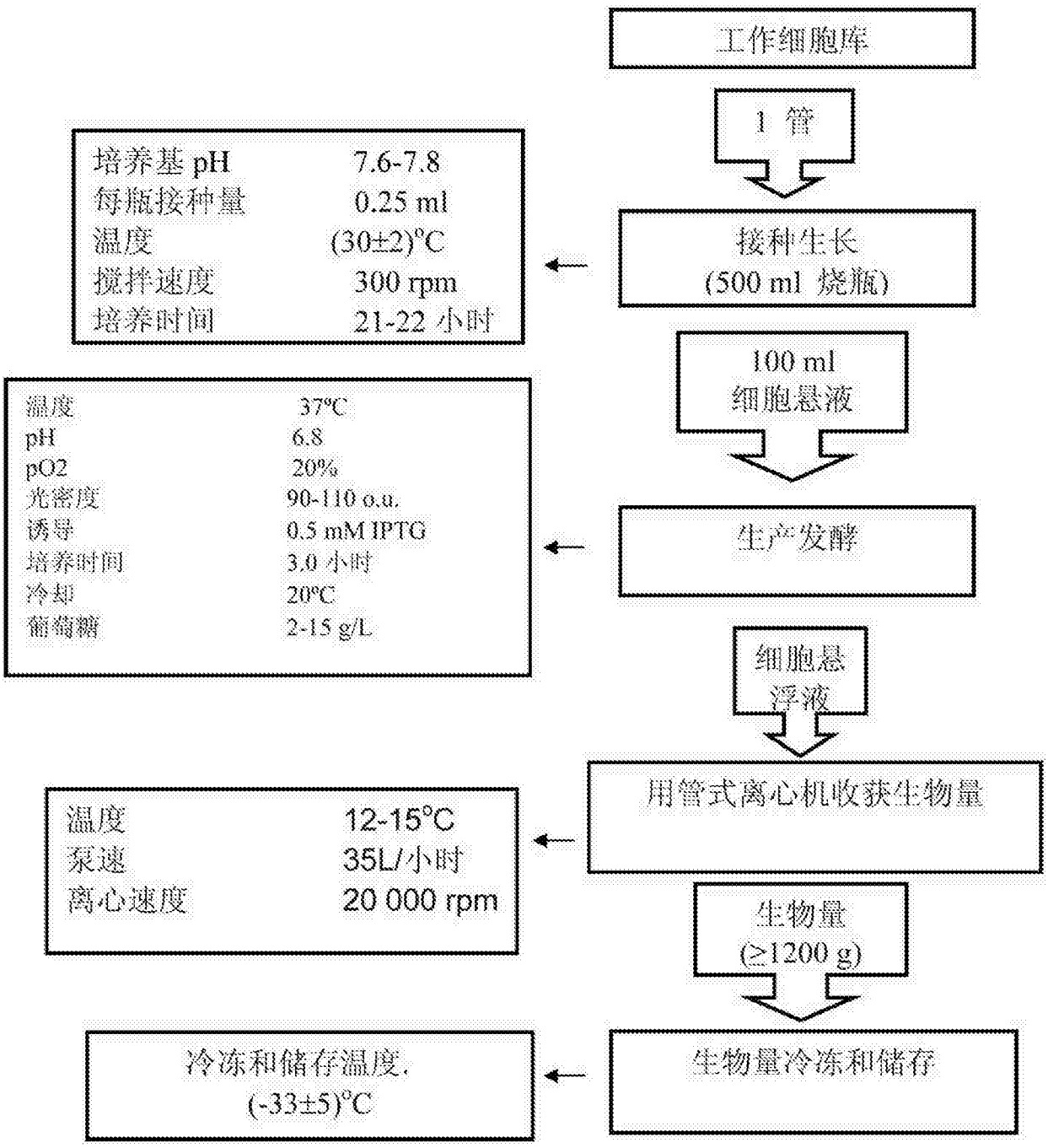
工作细胞库
1 管
接种生长
(500 ml 烧瓶)
培养基 pH 7.6-7.8
每瓶接种量 0.25 ml
温度 (30±2)°C
搅拌速度 300 rpm
培养时间 21-22 小时
100 ml
细胞悬液
生产发酵
温度 37°C
pH 6.8
pO2 20%
光密度 90-110 o.u.
诱导 0.5 mM IPTG
培养时间 3.0 小时
冷却 20°C
葡萄糖 2-15 g/L
细胞悬浮液
用管式离心机收获生物量
温度 12-15°C
泵速 35L/小时
离心速度 20 000 rpm
生物量
(≥1200 g)
生物量冷冻和储存
冷冻和储存温度.
(-33±5)°C

图 7

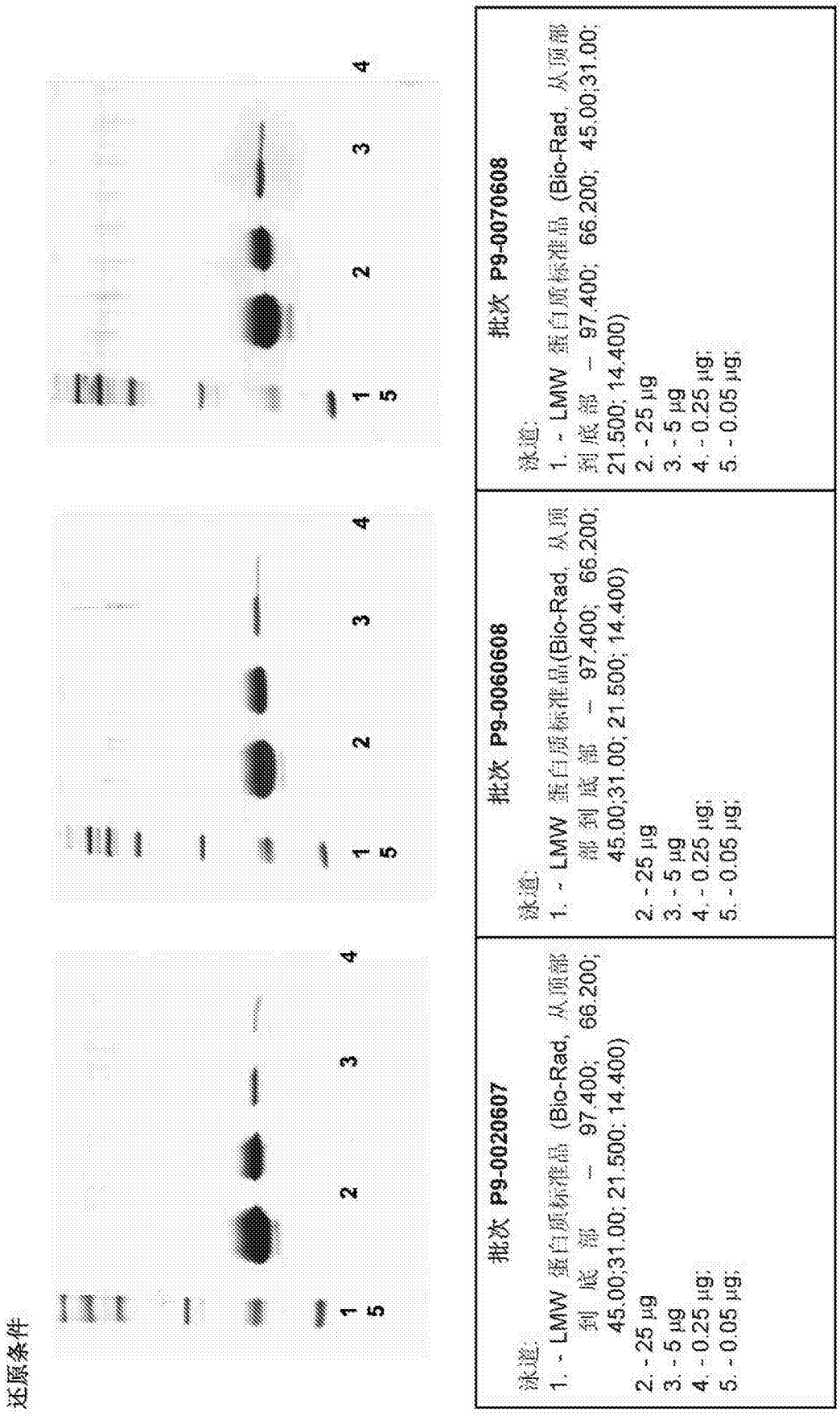
还原条件
1
2
3
4
5
批次 P9-0020607
泳道:
1. - LMW 蛋白质标准品 (Bio-Rad, 从顶部到底部 — 97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
批次 P9-0060608
泳道:
1. - LMW 蛋白质标准品(Bio-Rad, 从顶部到底部 — 97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
批次 P9-0070608
泳道:
1. - LMW 蛋白质标准品 (Bio-Rad, 从顶部到底部 — 97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;

图 8A

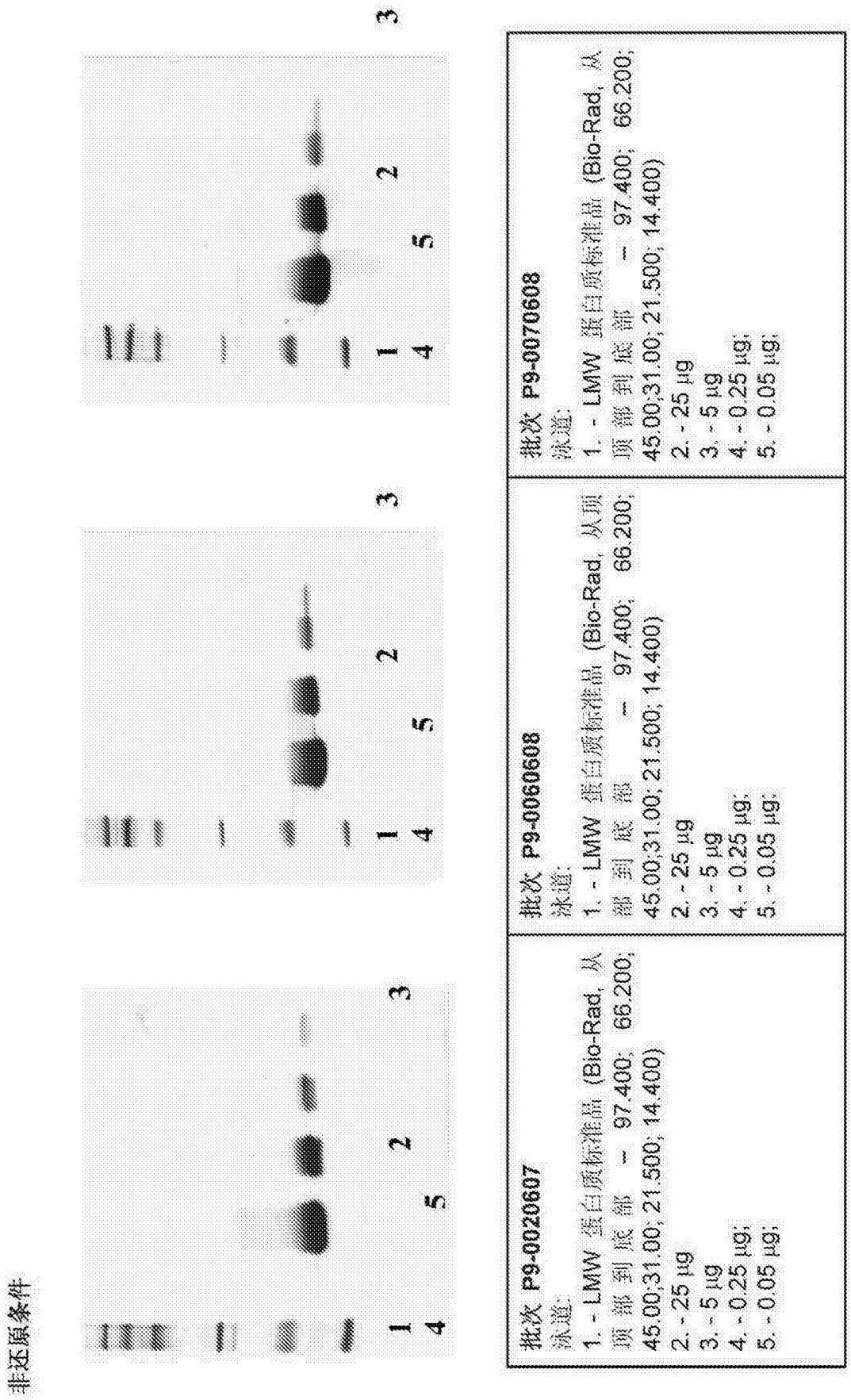
非还原条件
1
2
3
4
5
批次 P9-0020607
泳道:
1. - LMW 蛋白质标准品 (Bio-Rad, 从顶部到底部 – 97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
批次 P9-0060608
泳道:
1. - LMW 蛋白质标准品 (Bio-Rad, 从顶部到底部 – 97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
批次 P9-0070608
泳道:
1. - LMW 蛋白质标准品 (Bio-Rad, 从顶部到底部 – 97.400; 66.200; 45.00;31.00; 21.500; 14.400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;

图 8B

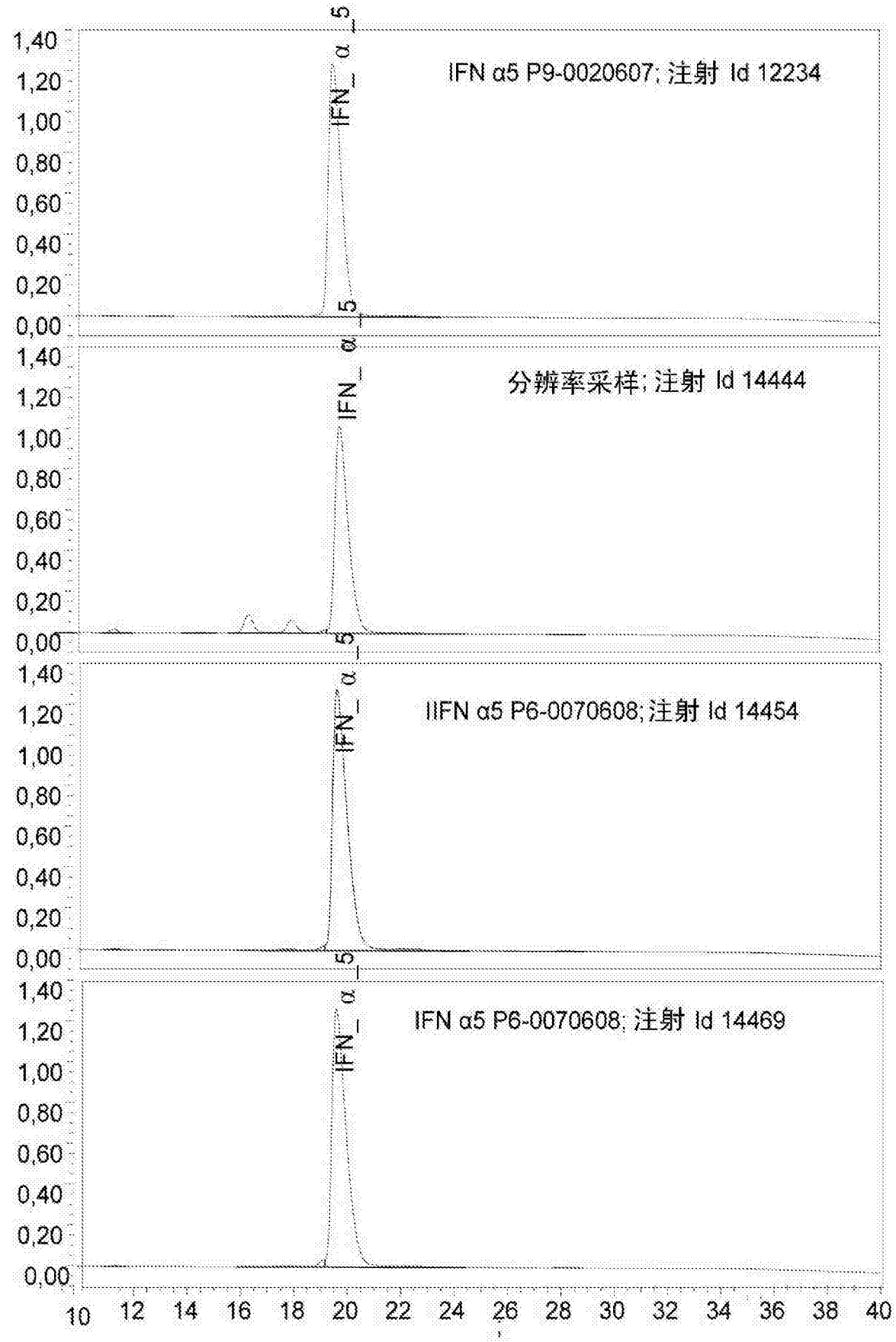
IFN_α_5
IFN α5 P9-0020607; 注射 Id 12234
分辨率采样; 注射 Id 14444
IIFN α5 P6-0070608; 注射 Id 14454
IFN α5 P6-0070608; 注射 Id 14469
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40

图 9

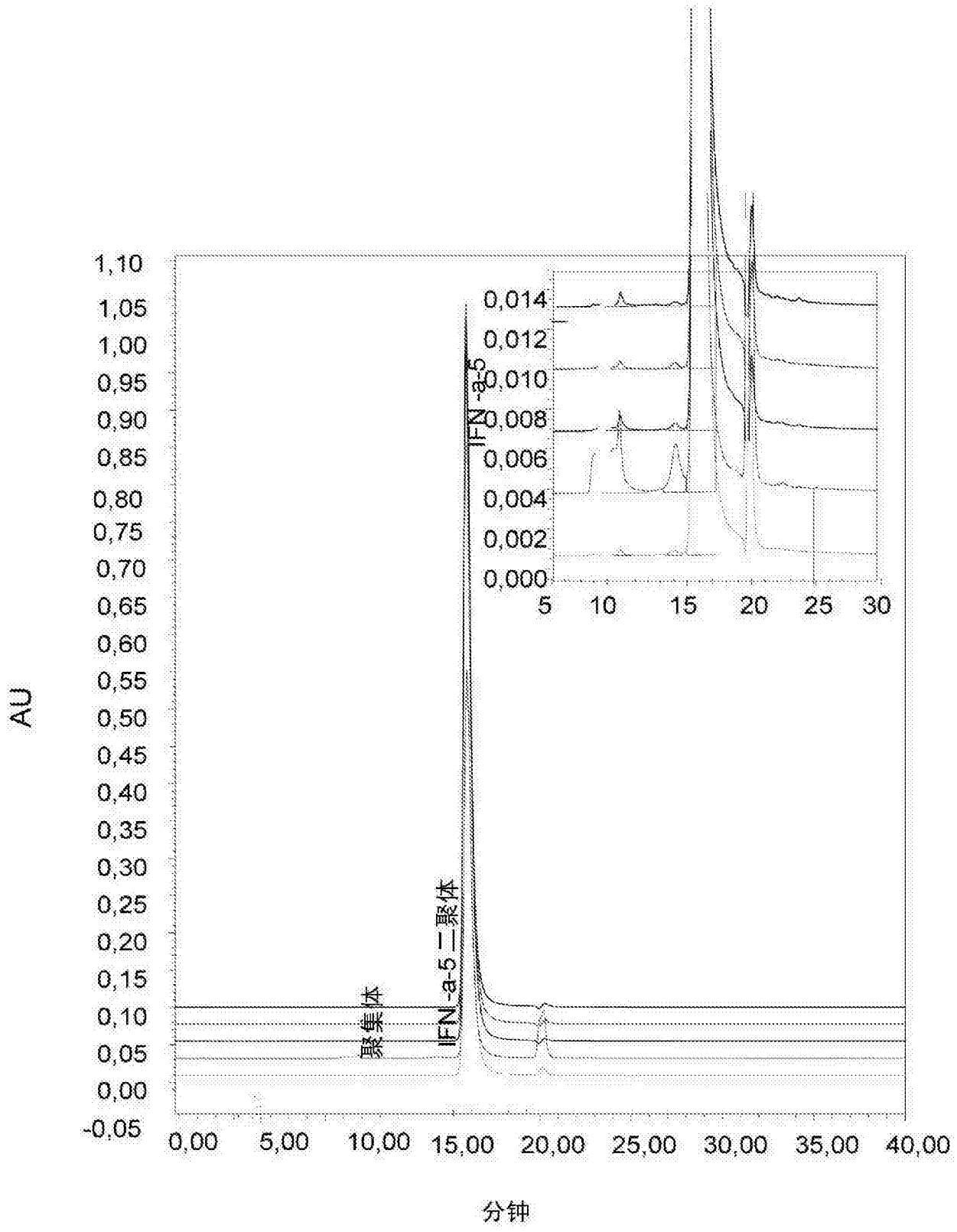
AU
1,10
1,05
1,00
0,95
0,90
0,85
0,80
0,75
0,70
0,65
0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
分钟
聚集体
IFN-a-5二聚体
IFN-a-5
0,014
0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
5
10
15
20
25
30

图 10

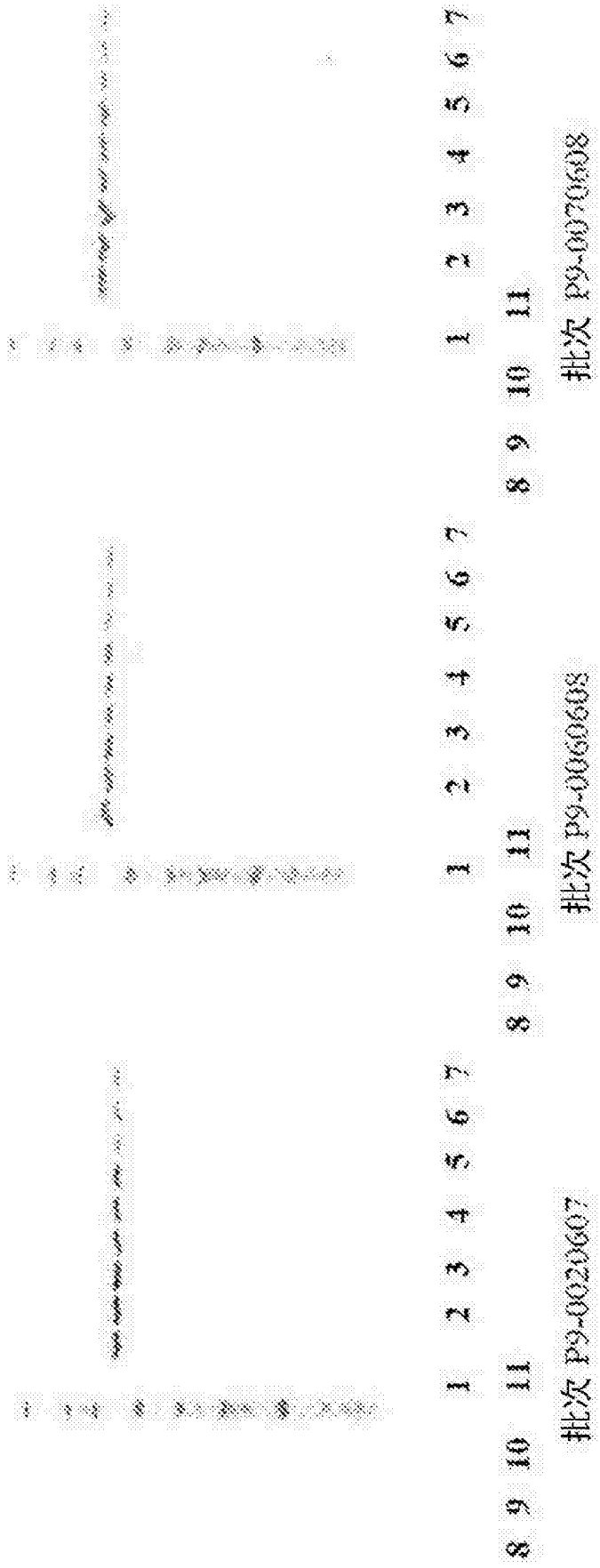
1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11
批次 P9-00706008
1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11
批次 P9-00606008
1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11
批次 P9-00206007

图 11

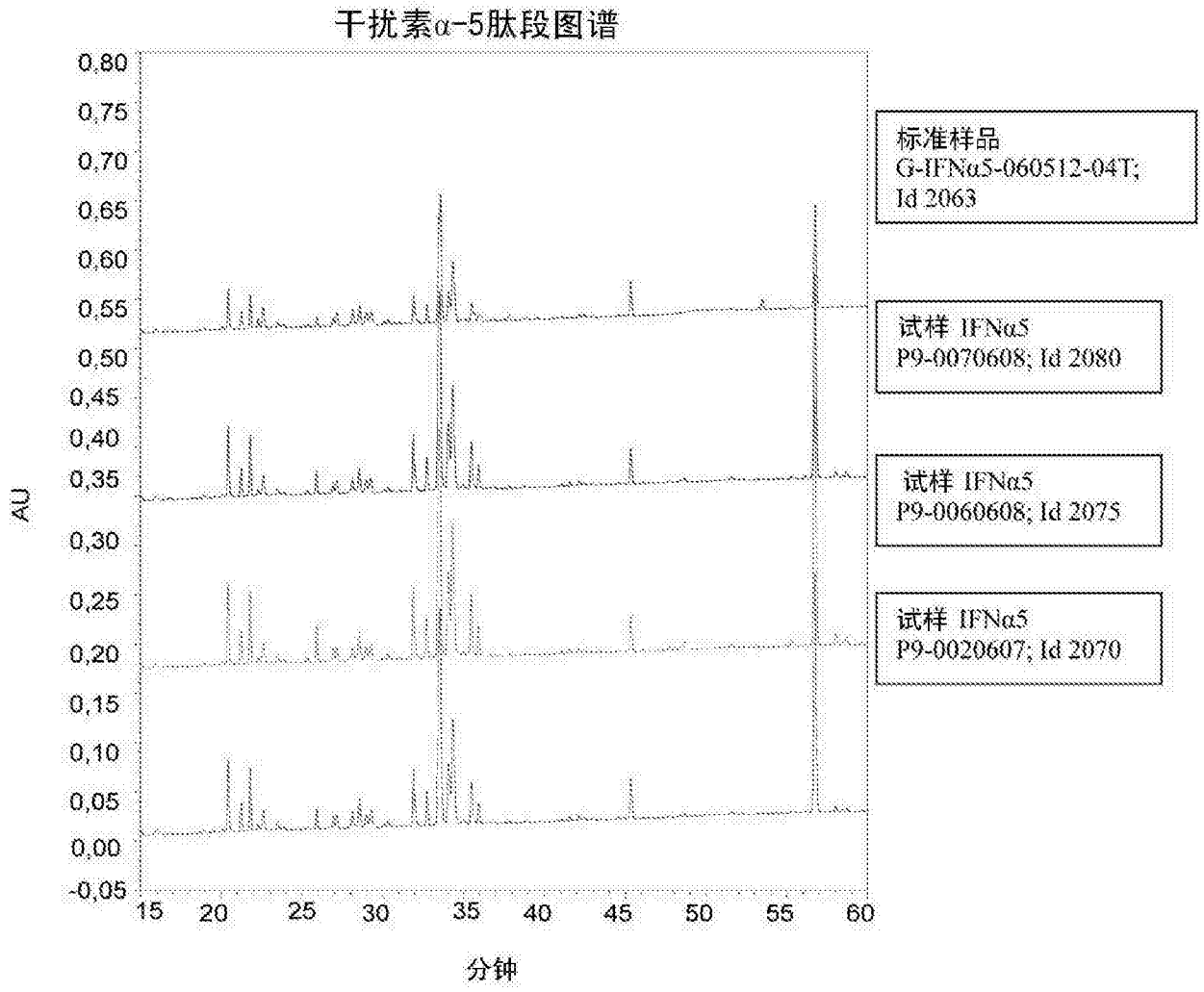
干扰素α-5肽段图谱
0,80
0,75
0,70
0,65
0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
AU
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
分钟
标准样品
G-IFNα5-060512-04T;
Id 2063
试样 IFNα5
P9-0070608; Id 2080
试样 IFNα5
P9-0060608; Id 2075
试样 IFNα5
P9-0020607; Id 2070

图 12