



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

257789
(11) (12)

(51) Int. Cl.⁴
C.12 N 15/00

- (22) Přihlášeno 22 05 85
(21) [PV 3684-85]
(32) (31) (33) Právo přednosti od 28 05 84
[8402861-2] Švédsko
(40) Zveřejněno 12 11 87
(45) Vydáno 15 12 88

(72) (73)
Autor vynálezu
a současně
majitel patentu

SVENSON STEFAN, ENSKEDE {Švédsko}

(54) Způsob čištění kontaminovaných peptidových nebo proteinových produktů získaných technikou rDNA

1.

2.

Způsob čištění kontaminovaných peptidových nebo proteinových produktů získaných technikou rDNA, například insulinu, interferonu nebo lidského růstového hormonu, kontaminovaných hydrofobními kontaminanty, které pocházejí z použitého mikrobiálního klonového hostitele, jako jsou například lipopolysacharidy, pocházející z *Escherichia coli*, který se provádí tak, že hydrofobní kontaminanty nesoucí elektrický náboj se separují od produktu působením elektrického proudu. S výhodou se separace kontaminantů provádí elektrodialýzou.

Vynález se týká způsobu čištění kontaminovaných peptidových nebo proteinových produktů získaných technikou rDNA (rekombinantní DNA).

Při přípravě proteinových nebo peptidových produktů pomocí techniky rDNA se využívá mikrobiálních klonových hostitelů, především bakterií nebo kvasinek.

Během zpracování a čištění těchto produktů vyráběných technikou rDNA se používá hlavně gelové permeační chromatografie na Sephadexu^(R), iontoměničové chromatografie a/nebo HPCL chromatografie s různými druhy kolon. Všechny tyto čisticí způsoby se zaměřují na odstraňování mikrobiálních kontaminantů pocházejících z klonových hostitelů (tzv. peptidy E. Coli, EPC) [viz „Journalen“, sv. 3, č. 12, 1983, str. 331 až 334, vyd. Kabi-Vitrum, Sverige AB]. Až do poslední doby byly tyto způsoby považovány za dostatečně účinné k odstranění výše uvedených kontaminantů pocházejících z hostitele. Kontrola čistoty takových produktů byla prováděna nejčastěji pomocí různých druhů technik využívajících elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, včetně použití disociačních činidel typu SDS atd. Bylo používáno i různých druhů imunostanovení, například ELISA a RIA. Kromě toho byly často prováděny testy na pyrogenitu an a Limulus amoebocytové lyzáty (LAL).

Přes čištění shora uvedenými postupy obsahují produkty získávané technikou rDNA stále ještě jako protilátky působící proti těmto proteinovým nebo peptidovým produktům, i když se rozsah tvorby protilátek zdál být nízký a tudíž z lékařského hlediska přijatelný. Nicméně odborníci v této oblasti upozorňují, že při registraci těchto produktů by měla být zachovávána opatrnost. [Läkartidningen, sv. 81, č. 8, 1984, str. 636, „Při registraci biosyntetických léčiv postupujte pomalu!“] V takových případech, kdy protein má být podáván po dlouhou dobu, jako je tomu u chorob trvajících po celý život (například diabetes), není totiž přijatelná ani nízká tvorba protilátek.

Základem tohoto vynálezu je poznatek, že i jiné než proteinové nebo peptidové kontaminanty, pocházející z mikrobiálního klonového hostitele, mohou vyvolávat imunologické reakce.

Vynález je založen na výsledcích výzkumu, které dokazují, že v důsledku hydrofóbní interakce může menší množství hydrofóbních kontaminantů z mikrobiálního klonového hostitele ulpět na proteinovém nebo peptidovém produktu během jeho zpracování z použitého produkčního z DNA prostředím. Tyto hydrofóbní kontaminanty, které pevně lpí na produktu, vytvoří potom epitopy a fúzní epitopy, které budou vyvolávat tvorbu protilátek, a to nejenom proti uvažovaným kontaminantům, ale i proti produktu vyrobenému technikou rDNA.

Dříve používané způsoby čištění byly pří-

liš „mírné“, než aby uvolnily produkt získaný rDNA technikou od těchto hydrofóbních kontaminantů, a ty kontaminanty, které jsou nejčastěji menší než proteinový nebo peptidový produkt, prošly zpracováním a čištěním, aniž byly odhaleny.

Způsobem podle tohoto vynálezu se tyto hydrofóbní kontaminanty, které vedou ke tvorbě epitopů a fúzních epitopů, oddělují od peptidového nebo proteinového produktu pomocí elektroseparace, jako je elektro-separace využívající gelotvorných látek, nebo elektrodialýzy, takže vyčištěný produkt po podání savcům, včetně člověku, nevyvolává imunologické reakce.

Předmětem vynálezu je způsob čištění kontaminovaných peptidových nebo proteinových produktů získaných technikou rDNA, například inzulinu, interferonu nebo lidského růstového hormonu, kontaminovaných hydrofóbními kontaminanty, které pocházejí z použitého mikrobiálního klonového hostitele, jako jsou například lipopolysacharidy, pocházející z *Escherichia coli*, který se vyznačuje tím, že hydrofóbní kontaminanty nesoucí elektrický náboj se separují od produktu působením elektrického proudu.

Výhodou elektroseparací je elektrodialýza. Podle jednoho provedení vynálezu je kontaminovaným produktem inzulin vyráběný technikou rDNA a hydrofóbními kontaminanty jsou lipopolysacharidy pocházející z *Escherichia coli*.

Hydrofóbní kontaminanty z použitého mikrobiálního klonového hostitele mají obvykle dostatečný vlastní náboj a lze je tudíž přímo separovat z kontaminovaného produktu, když se tento produkt podrobí elektro-separaci, například elektrodialýze. V takových případech, kdy hydrofóbní kontaminanty nemají dostatečný vlastní náboj, který by umožnil jejich přímou separaci, je možno se uchýlit k různému předběžnému zpracování, kterým se kontaminantům náboj dodá, jako je mírně alkalické působení, disociace pomocí disociačních činidel, například hydrochloridem močoviny nebo guanidinu, použití kaotropních iontů, například iontů draslíku, nebo použití chelátotvorných činidel, například EDTA.

Existují dva rozdílné způsoby zkoušení, zda protein-peptidový produkt získaný technikou rDNA je prostý kontaminujících hydrofóbních kontaminantů pocházejících z hostitele. Podle prvního způsobu se produkt kombinuje s protilátkami působícími proti hydrofóbním kontaminantům pocházejícím z použitého mikrobiálního klonového hostitele. Jestliže se protilátky vážou na produkt, je produkt kontaminován kontaminantami hostitele. Zjišťování množství protilátek vázaných na produkt se provádí například ELISA testem a udává velikost stupně, do kterého byl produkt vyčištěn. Výsledkem je možnost stanovení účinnosti různých čisticích způsobů, týkajících se odstranění hos-

titelských kontaminantů kontaminujících produkt.

Jiný způsob sledování čistoty produktu, který byl vyroben technikou rDNA a/nebo jestliže produkt byl izolován z jiného zdroje, zahrnuje kombinaci produktu před čištěním s předem určeným množstvím radioaktivně nebo jinak značeného hydrofobního hostitelského kontaminantu, načež se produkt, kontaminovaný značeným kontaminantem z hostitele, a popřípadě neznačený kontaminant z hostitele čistí, načež se stanoví množství značeného kontaminantu z hostitele ve vyčištěném produktu. Jestliže v produktu není zjištěn značený kontaminant z hostitele, je produkt čistý. Je-li ve vyčištěném produktu zjištěn značený hostitelský kontaminant, nebylo čištění dost účinné pro odstranění všech hostitelských kontaminantů, tj. jestliže produkt je kontaminován značenou kontaminantou, je také kontaminován neznačeným kontaminantem. To umožňuje stanovení účinnosti různých čistících způsobů.

Mikrobiálním klonovým hostitelem, kterého se zde nejčastěji používá, je *Escherichia coli* K 12, k tomuto účelu se však používá kromě *E. coli* i jiných bakteriálních hostitelů, například *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Byly popsány i výsledky pokusů s kvasinkami, například *Saccharomyces cerevisiae*.

Techniky rDNA bylo již použito při výrobě četných potenciálních léčiv, například lidského růstového hormonu, inzulinu a interferonu, avšak zatím jediným proteinem dostupným na švédském trhu a vyrobený technikou rDNA je inzulin nesoucí obchodní název Humulin. Humulin je vyráběn za použití *E. coli* K 12 jako klonového hostitele. Ve výše uvedeném článku v „Journalen“, svazek 3, č. 12, 1983, vyd. Kabi Vitrum Sverige AB, se uvádí na str. 333, že je možné, i když s určitými potížemi, získávat protilátky pomocí kompletního Freundova adjuvans a sensibilizovat pokusná zvířata proti polypeptidům z *E. coli* (ECP) (pocházejícím z hostitele použitého k výrobě humulinu, avšak bez genetického kódu pro A a B řetězce inzulinu). Kromě toho je zřejmé, že Humulin není pyrogenním u králíků a obsahoval < 0,6 ng/mg takzvaného bakteriálního endotoxinu, který se rovná lipopolysacharidu (LPS). Endotoxin (LPS) nemohl být prokázán ani *Limulus* amoebocytovým lyzáto-
tovým testem (LAL), který mnozí považují za nejcitlivější test na endotoxin (LPS). Vhodnost LAL testu je nicméně zpochybňována, zejména v případě, když LPS je v kombinaci s jinými hydrofobními látkami.

Z toho, co bylo řečeno vpředu, lze učinit závěr, že podle dosavadního stavu techniky nelze stanovit *in vitro* malá množství bakteriálních kontaminantů. V souhlase s tím, co bylo výše řečeno, mohou tyto produkty nicméně vyvolávat tvorbu protilátek nejenom proti uvedeným kontaminantům, nýbrž i proti produktu. V této souvislosti je ob-

zvláště zajímavé, že endotoxin (LPS) je velmi účinnou imunologickou látkou. LPS je skutečně jednou z neúčinnějších známých látek stimulujících polyklonální buňky B.

Pokusy popsané níže ukazují, že malá množství endotoxinu z klonového hostitele *E. coli*, které sestávají z lipopolysacharidů, budou ulpívat na Humulinu, jak je demonstrováno pomocí radioaktivně značeného lipopolysacharidu z *E. coli* K 12.

Kromě toho je demonstrováno, že tento radioaktivně značený kontaminant provází Humulin po gelové chromatografii. Pomocí pokusně kontaminovaného Humulinu je demonstrováno, že radioaktivně značený lipopolysacharid z *E. coli* K 12 (tj. hostitele) se odděluje samotný a odstraní se z Humulinu po čištění pomocí elektrodialýzy.

Popis výkresů

Obr. 1 znázorňuje gelovou chromatografii ^{14}C -značeného LPS z *E. coli* K 12 (křivka A), Humulinu (v OD₂₈₀) (křivka B), ^{14}G -značeného LPS z *E. coli* K 12 + Humulinu (v cpm) (křivka C), a ^{14}C -značeného LPS z *E. coli* K 12 + Humulinu (v OD₂₈₀) (křivka D). Byly použity následující pokusné podmínky: kolona Sepharosy G 75 (9 mm × 550 mm) eluovaná vodou —6 mg/ml; průtok 4,0 ml/hod; objem frakce 0,5 ml.

Obr. 2 znázorňuje elektrodialyzační čištění Humulinu kontaminovaného LPS z *E. coli* K 12, přičemž křivka A udává procento zbylého Humulinu a křivka B udává procento zbylého ^{14}C -značeného LPS z *E. coli* K 12.

Obr. 3 schematicky znázorňuje otevřenou dialyzační a elektrodialyzační nádobu 1 (použitou v příkladu 2), například z plexiskla a trubkovitou dialyzační komůrkou 3 uzavřenou dvěma dialyzačními membránami 2; značky 4, popřípadě 5, označují platinovou anodu, respektive platinovou katodu.

Materiály použité v příkladech

Humulin regular pro injekční použití 40 IU/ml (Kabi-Vitrum, Švédsko); U- ^{14}C -značený LPS z *E. coli* K 12 (1 000 cpm/μg), značený *in vivo* U- ^{14}C -galaktózou a U- ^{14}C -glukózou (NEC-520 a NEC-042, NEN, Velká Británie), který byl vyčištěn takzvanou PCP extrakcí, jehož čistota byla ověřena SDS gelovou elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s následným barvením stříbrem a autoradiografií. Studie s ^1H -NMR, která zahrnovala srovnání s neradioaktivně značeným referenčním LPS z *E. coli* K 12, ukázala, že tento LPS byl čistý.

Pro pokusy pomocí gelové permeační chromatografie byl použit Sephadex G 75 (síťovaný perlový dextran, Pharmacia, Uppsala, Švédsko), eluční činidlo sestávající z dvakrát ve skle destilované vody, obsahující 16 mg/ml glycerolu p. a. (Merck, NSR).

Při elektrodialyzačním pokusu byla použi-

ta elektrodialyzační lázeň (viz obr. 3/1) a zdroj elektrické energie (LKB, typ 2197, LKB, Švédsko) při 160 V a 20 mA. Podmínky elektrodialýzy zahrnovaly výše uvedený systém voda—glycerol a dialyzační membrány (21 DMOOC227 P7F20, Union Carbide, Chicago, USA).

Příklad 1

Studie vazby ^{14}C -značeného LPS z *E. coli* K 12 na Humulin

2,5 mg Humulinu (stanoveno pomocí Bio-Rad proteinové analýzy, Bio-Rad, Mnichov, NSR) v 1,0 ml směsi voda/glycerol, jak uvedeno výše, byly smíchány se 100 μg ^{14}C -značeného LPS z *E. coli* K 12 a inkubovány při teplotě místnosti (23 °C) za mírného míchání po dobu dvou hodin. Potom byla směs vnesena do G75 kolony (popsána výše). Eluční profil této směsi je ukázán na obr. 1 (viz křivky C a D). Tento pokus ukazuje jasně, že valná část ^{14}C -značeného LPS migrovala spolu s Humulinem. Dále ukazuje obr. 1, že Humulin samotný má retenční dobu v podstatě identickou s retenční dobou pokusně kontaminovaného Humulinu (viz obr. 1, křivka B). Kromě toho obr. 1 ukazuje (křivka A), že když byl použit jenom ^{14}C -značený LPS, byl eluován s počáteční frakcí (prázdnou) a měl v důsledku toho retenční dobu zcela a zřetelně odlišnou od retenční doby směsného produktu. Důvod, proč dochází k tomuto posledně zmíněnému elučnímu profilu u ^{14}C -značeného LPS, spočívá v tom, že tento LPS je přítomen ve formě micel.

Závěrem lze shrnout, že ^{14}C -značený LPS *E. coli* K 12 je vázán silně na Humulin.

Příklad 2

Studie čištění pokusně kontaminovaného Humulinu pomocí elektrodialýzy

Frakce 48-63 „čištěného“ Humulinu pomocí gelové průnikové chromatografie na G75 v soulase s příkladem 1, byly spojeny a celková radioaktivita byla zjištěna jako 6 000 cpm (impulsů za minutu) v celkovém množství 7,53 ml. Tato radioaktivita v Humulinu odpovídá tedy množství 6 μg distribuovaného v 2,5 mg Humulinu, tj. každý miligram Humulinu nese 2,4 μg kontaminujícího LPS *E. coli* K 2. Tento příklad ukazuje odstranění tohoto kontaminantu pomocí elektroseparatoru, přičemž se používá výše uvedeného materiálu a zařízení schematicky znázorněného na obr. 3. Tato kontaminovaná frakce Humulinu byla podrobena elektrodialýze (při 160 V, 20 mA), a vzorky byly odebírány v různé době. Bylo stanoveno množství radioaktivity v dialyzačních membránách a množství Humulinu. Obr. 22 ukazuje výsledek, ze kterého je zřejmé, že po celou dobu pokusu veškerý

Humulin zůstával v dialyzačních membránách (viz křivku A), ale že ^{14}C -značený LPS *E. coli* poklesl již po uplynutí doby 40 minut elektrodialýzy na 55 % (viz křivku B). Po dvou hodinách elektrodialýzy zbylo jenom 17 % kontaminujícího LPS.

Souhrnem lze říci, že elektroseparatoru podle tohoto pokusu pomocí elektrodialýzy ukazuje, že kontaminující hydrofobní látky z hostitele (LPS) lze účinně odstranit z proteinpeptidových produktů vyráběných technikou rDNA.

Příklad 3

Sledování čistoty produktu smícháním produktu s protilátkami proti hydrofobním kontaminantům

Monoklonální protilátky tříd IgG a IgM byly vyprodukovány z myši Balb/c hybridizací lymfocytů izolovaných ze sleziny myši imunizovaných vyčištěním lipopolysacharidem (LPS) z *E. coli* K 12 buňkami sp2 za vzniku hybridomových klonů, které byly vybírány enzymově-imunosorbentovým testem (ELISA) pro specifické vyjádření Ig se specificitou ke koreoligosacharidové části LPS, přičemž tohoto LPS se použilo jako krycího antigenu v testech ELISA. Po následujícím subklonování monoklonálních protilátek produkujících zředovací technikou hybridomy, byly tyto hybridomy pěstovány in vitro i in vivo (tj. jako ascites na Balb/c myších). Monoklonální protilátky byly izolovány buď běžnou gelovou průnikovou chromatografií (IgM), nebo afinitní chromatografií s afinitou k A-proteinu pro izolaci IgG monoklonálních protilátek.

Čistota každého použitého preparátu monoklonálních protilátek byla potvrzena pomocí izoelektrického zaostření, identifikace podtřídy a lehkého řetězce byla provedena za použití komerčně dostupných specifických anti-myších protilátek o lehkém a těžkém řetězci podvojnými radiálními imunními difúzními testy.

Vyčištěný vepřový inzulin od firmy Novo Industri A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Dánsko, byl pokusně kontaminován ^{14}C -značeným přečištěným LPS z *E. coli* smícháním Actrapidu 400 IU s 0,1 mg LPS v celkovém objemu 10 ml. Po inkubaci při teplotě 25 °C po dobu 5 hodin byla směs chromatografována na Sepharose G75 (Pharmacia, Švédsko), a inzulin byl hodnocen na základě měření optické hustoty při 280 nanometrech a podle toho shromažďován.

Tento preparát byl použit po extenzivní dialýze proti destilované vodě, obsahující 1 % glycerolu a 0,7 M NaCl, jako krycí antigen v testu ELISA a srovnán s nekontaminovaným originálním produktem co do specifické vazby monoklonálních IgG protilátek specifických k myším anti-koreoligosacharidu z *E. coli* K 12, připravených, jak

je popsáno vpředu. Krycími dávkami každého z obou antigenů byla logaritmická ředění od 1 000 mikrogramů proteinů (měřeno podle Lowryho a spol.) do 0,001 mikrogramu v 1 ml.

V testech ELISA vykazovaly pokusně kontaminované produkty vazby myších anti-E. coli koreoligosacharidových monoklonálních

IgG protilátek sestupně ke hladině kontaminace nižší než 0,01 mikrogramu LPS z E. coli K 12 na mg inzulinu.

Tento příklad dokazuje, že monoklonální protilátky proti hydrofobním kontaminantům z hostitele (LPS) provázející proteinový produkt, se vážou na proteinový produkt, je-li tento kontaminován.

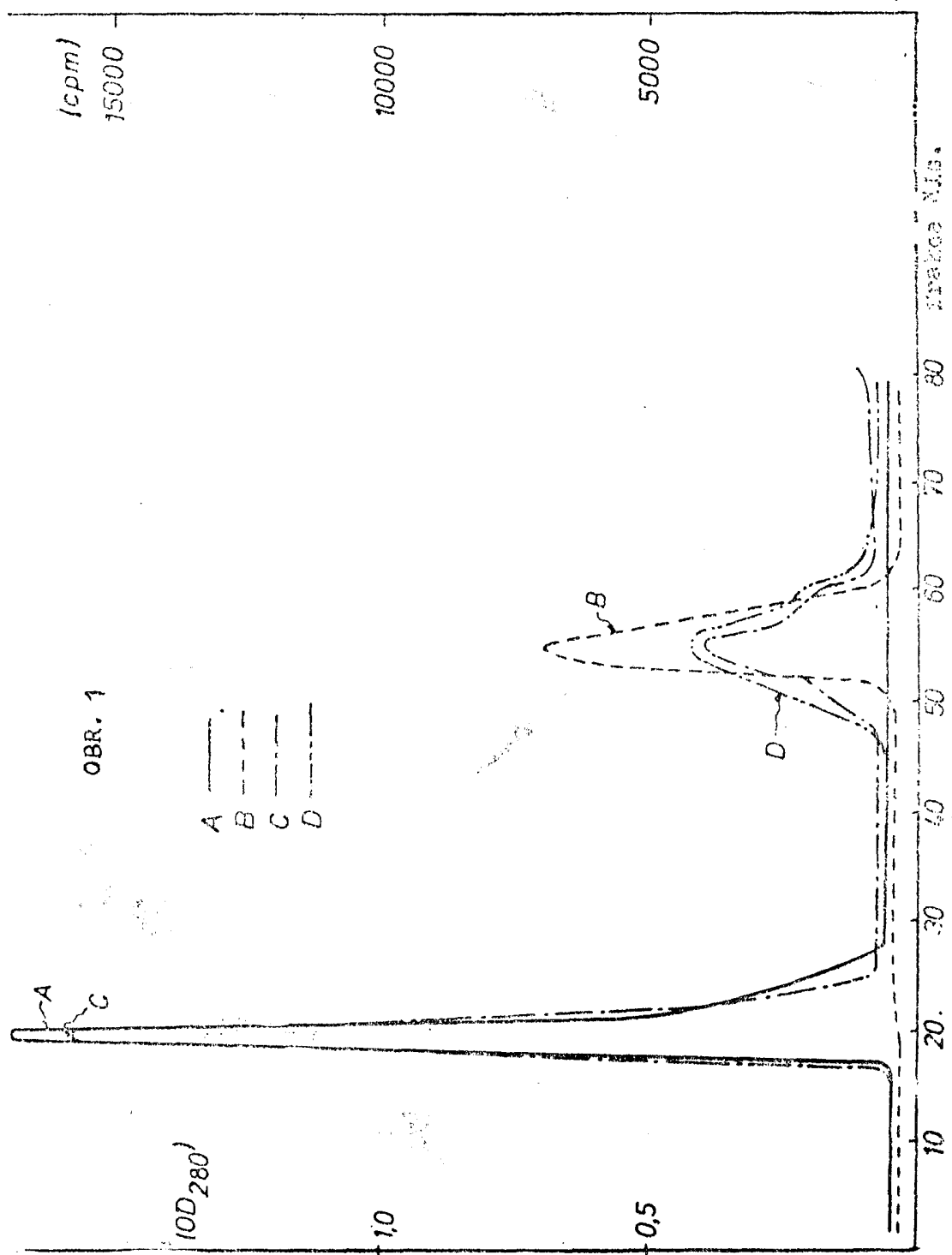
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

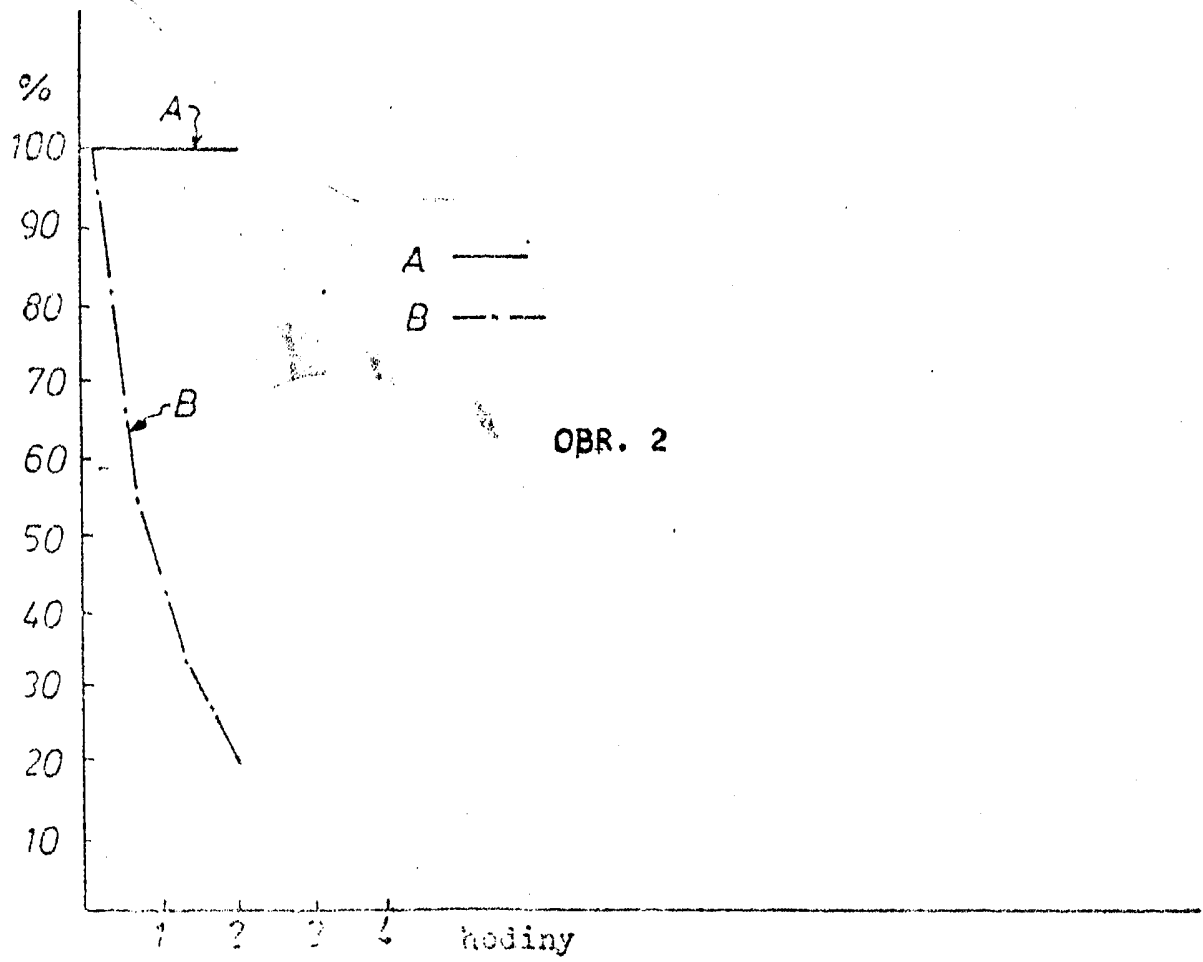
1. Způsob čištění kontaminovaných peptidových nebo proteinových produktů získaných technikou rDNA, například inzulinu, interferonu nebo lidského růstového hormonu, kontaminovaných hydrofobními kontaminanty, které pocházejí z použitého mikrobiálního klonového hostitele, jako jsou například lipopolysacharidy, pocházející z

Escherichia coli, vyznačující se tím, že hydrofobní kontaminanty nesoucí elektrický náboj se separují od produktu působením elektrického proudu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že separace kontaminantů od produktu se provádí elektrodialýzou.

3 listy výkresů





257789

OBR. 3

