HU000229056B1

(19) **HU**

(11) Lajstromszám: **229 056**

(13) **B1**

MAGYARORSZÁG
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 05 00029**
(22) A bejelentés napja: **2002. 02. 05.**

(40) A közzététel napja: **2005. 03. 29.**
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 07. 29.**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/09	*(2006.01)*
C07K 1/18	*(2006.01)*
C07K 1/20	*(2006.01)*
C12N 15/12	*(2006.01)*
C12P 21/02	*(2006.01)*
C07K 144/75	*(2006.01)*
C07K 145/15	*(2006.01)*

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/IT 02/00065
(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 03066676

(72) Feltaláló(k):
Maglione, Domenico, Anagni (IT)
Battisti, Mauro, Carpineto (IT)
Conti, Ettore, Rocca di Papa (IT)
Salvia, Giuseppe, Catania (IT)
Tucci, Marina, Anagni (IT)

(73) Jogosult(ak):
GEYMONAT S.p.A., Anagni (IT)

(74) Képviselő:
dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Eljárás placenta eredetű rekombináns növekedési faktor előállítására**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát rekombináns, placenta eredetű növekedési faktor genetikailag módosított sejtekből történő kivonására és tisztítására szolgáló eljárás képezi.

P97000619

29003

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

Eljárás placenta eredetű rekombináns növekedési faktor előállítására

A találmány tárgyát rekombináns, placenta eredetű növekedési faktor genetikailag módosított sejtekből történő kivonására és tisztítására szolgáló eljárás képezi.

A placenta eredetű növekedési faktor (PLGF) egy homodimer glikoprotein, amelynek szerkezete hasonló a vaszkuláris endothél eredetű növekedési faktor (VEGF) szerkezetéhez. A PLGF fehérjét kódoló teljes polinukleotid szekvenciát Maglione és Persico írták le az EP-B-550519 lajstromszámú szabadalomban (WO-A-92/06194) olaszországi elsőbbséget igényelve az 1990. 09. 27. dátummal. A PLGF ARN hasításának alternatív módszerei a placenta eredetű növekedési faktor három homológ formájának létrehozásához vezetnek, nevezetesen a PLGF-1, PLGF-2 és a PLGF-3 formákhoz, amelyek polipeptid szekvenciái egymástól eltérőek és mindegyik leírásra került a szakirodalomban.

A fentebb említett szabadalomban egyúttal leírásra került egy eljárás a PLGF faktor előállításra, amelynek során indukálható prokarióta expressziós rendszert alkalmaztak; a rendszerben olyan expressziós vektorral módosított gazdasejteket használtak fel, amelyekben a humán PLGF gént indukálható promóter (közvetlen vagy közvetett) szabályozása alatt építették be. A PLGF expresszió megfelelő aktivátorral történő indukálása után a sejteket inkubálták, izolálták és lízisnek vetették alá.

Az így kapott nyers lizátum fehérjék komplex keveréke, amely az expresszált PLGF fehérje kis mennyiségeit tartalmazza és alacsony specifikus aktivitással rendelkezik. Valójában az ismert eljárásban a fehérje expressziót alacsony sejtkoncentrációt mutató tenyészetekben indukálják, ami egyértelmű az indukció alkalmazásával mért alacsony szintű optikai sűrűség értékéből, ami 0,2 és 0,6 OD között van 600 nm hullámhossznál. Továbbá a fentebb említett dokumentumban leírt eljárás nem tartalmaz további tisztítási lépéseket az expresszált fehérjére. Ezen okból a WO-A-92/06194 találmányi bejelentés szerint kapott lizátumok ilyen állapotban nem felelnek meg arra, hogy közvetlenül gyógyhatású anyagok előállításában alkalmazzuk ezeket.

Ugyanezen placenta eredetű faktor tisztításának egy bonyolultabb eljárását írták le Maglione és munkatársai [Maglione és mtsai.: Il Farmaco 55 165 (2000)]. Azonban az eljárás leírása csupán egy egyszerű listát biztosít az ismert alkalmazható módszerekről, a körülmények és a kísérleti részletek leírása nélkül, amelyek létfontosságúak a PLGF fehérje olyan tisztaságban és mennyiségben történő előállításhoz, amely szükséges a gyógyszerészeti felhasználáshoz.

A találmány tárgyát képezi egy új eljárás a bakteriális eredetű sejtekben expresszált rekombináns PLGF kivonására és tisztítására, amely lehetővé teszi, hogy a PLGF fehérjét olyan magas szintű tisztaságban és olyan kitermelésekkel állítsuk elő, hogy iparilag alkalmazható legyen gyógyhatású készítmények előállítására.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan eljárás, amelynek segítségével a PLGF fehérjét lényegében aktív formában lehet előállítani (nagyobb, mint 98,5%), amely főleg dimer (legalább 70%) és multimer formákból áll és kevesebb, mint 1,5% mennyiségben tartalmaz monomer forma maradványokat (kis aktivitású vagy inaktív).

A találmány alapját a tisztítási módszerek egy olyan sorozatának az azonosítása képezi, amelyek különösen jól alkalmazhatóak a bakteriális sejtekben expresszált humán PLGF kivonására és tisztítására. A találmány alapját képezi továbbá az optimális működési feltételek meghatározása az egyes módszerek vonatkozásában és figyelembe véve a tisztításra kerülő anyag fizikai-kémiai jellemzőit.

A találmány tárgyát képezi tehát egy eljárás a rekombináns placenta eredetű növekedési faktor (PLGF) kivonására és tisztítására, amelyet a következő lépéseket magába foglalva egy indukálható prokarióta expressziós rendszer segítségével expresszálunk: (1) bakteriális sejteket fermentálunk, (2) a zárványtesteket („inclusion bodies") kivonjuk és megtisztítjuk, (3) az expresszált fehérjét renaturáljuk, (4) ioncserés kromatográfiát hajtunk végre, (5) fordított fázisú kromatográfiát hajtunk végre és (6) kívánt esetben befejező lépésekként ultraszűrést, formulázást és liofilizálást hajtunk végre. A találmány szerinti eljárásnak megfelelően a fermentációt (1. lépés) addig végezzük, míg a táptalajban magas baktérium koncentrációt nem érünk el - amelyet a táptalaj magas optikai sűrűsége jelez - mielőtt az indukálási lépést megvalósítjuk. A 2. lépésben bakteriális lízist, a DNS roncsolását és a zárványtestek izolálását végezzük el. Az expresszált fehérje renaturációját (3. lépés) úgy végezzük el, hogy a zárványtesteket denaturáló pufferben szolubilizáljuk és az expresszált fehérjét - legalább részlegesen – átalakítjuk a dimer formába. Végül a 4. és az 5. lépésben az expresszált fehérje dimer és multimer formáit elválasztjuk a monomer formától és tiszta formában izoláljuk, amelyet ezt követően ultraszűrünk és liofilizálunk az általánosan alkalmazott liofilizáló és formulázó segédanyagok jelenlétében.

A találmány tárgyát képezi specifikusan a fentebb leírt eljárás az emberi eredetű PLGF-1 fehérje kivonására és tisztítására, de az eljárás lényegében ugyancsak alkalmazható állati eredetű PLGF-1 esetében is.

A találmány szerinti eljárás előnyösen lehetővé teszi az expresszált fehérje kitermelések 30-50-szeres növelésének elérését a technika állása szerint ismert módszer által biztosított ki-

termeléshez képest. A leírás szerinti eljárás továbbá lehetővé teszi nagymértékben tiszta fehérje előállítását magas specifikus aktivitás mellett és lényegében dimer formában.

A találmány tárgyát képezi továbbá az aktív placenta eredetű növekedési faktor, amelyet a találmány szerinti eljárás segítségével állítunk elő és amely mentes mindenféle visszamaradó fehérjétől vagy más bakteriális eredetű szennyezőtől, valamint kevesebb, mint 1,5% monomer formában megtalálható fehérjét tartalmaz.

Az 1. ábra az 1. lépés követése során redukáló körülmények között végzett SDS-PAGE elektroforézis eredményeket mutatja be. A Pre1 és Pre2 az indukció előtti ellenőrzéseket képviseli, amelyeket az alábbiak szerint készítettünk elö: Nem sokkal az indukció előtt körülbelül 0,064 optikai abszorpciós egységnek (600 nm hullámhosszon mérve, OD600) megfelelő táptalaj mennyiséget vettünk ki és ötszörösre hígítottuk vízzel. Ebből a hígításból 20 µl mennyiséget vettünk ki és 20 µl redukáló puffert adtunk hozzá, majd felforraltuk. Ez utóbbi oldatból 20 µl mennyiséget vittünk fel az SDS-PAGE mátrixra. A Post1 és a Post2 az indukció utáni ellenőrzéseknek felel meg, amelyeket az előbbiekkel megegyező módon készítettünk elö. M jelzi a molekulatömeg markerek keverékét. Az indukció utáni oszlopokban (Post1 és Post2) egy sáv látható éppen a 14,3 kDa molekulatömeg marker felett, amely lényegében hiányzik az indukció előtti oszlopokban (Pre1 és Pre2) ami a zárványtestek formájában expresszált és elkülönült PLGF-1 fehérjének felel meg.

A 2. ábra a Q-Sepharose Fast Flow gyantán végzett anioncserélő kromatográfia monitorozó kromatogramját mutatja be. Az x-tengelyen tüntettük fel az elúciós térfogatot (ml) és az y-tengelyen az optikai abszorpciós egység látható (OD). Az első elúciós csúcs, amelyet 20% B pufferrel (200 mM NaCl) végzett elúcióval kaptunk, a lényegében dimer formában található PLGF-1 fehérjének felel meg, de tartalmaz szennyeződéseket és a monomer formát. Az ezt követő csúcs, amelyet 100% B pufferrel kaptunk (1 M NaCl), olyan szennyezőket tartalmaz, amelyeket eldobtunk.

A 3. ábra az RP Source 30 gyantán végzett fordított fázisú kromatográfia első elúciós lépcsőjének a monitorozó kromatogramját mutatja be. Az x-tengelyen az elúciós térfogatot (ml) tüntettük fel, az y-tengelyen az optikai abszorpciós egység (OD) látható. Az első nagyobb térfogatú elúciós csúcs a különböző szennyeződéseknek felel meg, amelyek nem kötődnek a gyantához. A második csúcs a monomer formában található PLGF fehérjének felel meg, amelyet izokratikus körülmények között eluáltunk (kísérletesen megállapítva ez körülbelül 10-15% B puffernek felel meg).

A 4. ábra az RP Source 30 gyantán végzett fordított fázisú kromatográfia második elúciós lépcsőjének a monitorozó kromatogramját mutatja be. Az x-tengelyen az elúciós térfogatot (ml) tüntettük fel, az y-tengelyen az optikai abszorpciós egység (OD) látható. Az elúciós csúcs a dimer-multimer formában található PLGF fehérjének felel meg.

Az 5. ábra a teljes eljárás végső monitorozása során az SDS-PAGE elektroforézissel kapott eredményeket mutatja be. A Prerefol és a Postrefol az expresszált fehérje renaturációját megelőző és azt követő (3. lépés) ellenőrzéseket jelenti. QFF képviseli a Q-Sepharose Fast Flow gyantáról eluált csúcsot, amely a fehérjét tartalmazza, főleg dimer formában. A Mon a monomer formát tartalmazó csúcsot jelenti. A Dim képviseli az RP Source 30 gyantán végzett fordított fázisú kromatográfia második további lépése során eluált csúcsot. Megjegyezzük, hogy a renaturálás előtt az expresszált fehérje főleg monomer formában található. A renaturálás után a fehérje egy része dimer formában található. Az ezt követő QFF és RF 30 kromatográfiával végzett tisztítás lehetővé teszi a PLGF-1 fehérje előállítását magas fokú tisztaságban.

A bakteriális gazdasejtek genetikai módosítását Maglioni és munkatársai írták le a korábban már említett szabadalomban [EP-B-0550519 (WO-A-92/06194)]. Ennek érdekében bakteriális sejteket transzformáltak expressziós vektor bejuttatásával, amely expressziós vektor a PLGF-1 faktort kódoló humán génnek megfelelő inszertet tartalmazott. A teljes gén szekvencia a szakirodalomban ismert és szabadon hozzáférhető. Egy ilyen szekvenciát tartalmazó plazmidot letétbe helyeztek az ATCC-nél a 40892 ATCC katalógus számon. Az expressziót a T7 fág RNS polimeráz rendszer szabályozása alatt végezték és az indukálás IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) segítségével történik.

Kétségtelen, hogy további indukálható prokarióta expressziós rendszerek is alkalmazhatóak. A kereskedelemben beszerezhető ilyen rendszerekre például szolgálhatnak a következők:

(1) pBAD expressziós rendszer (Invitrogen BV) amelyben a fehérje szintézise az araBAD promóter irányítása alatt történik és különböző E. coli törzsekben arabinóz segítségével indukálható.

(2) T7 expressziós rendszer (Invitrogen BV vagy Promega) amelyben a fehérje szintézisét a T7 fág RNS polimeráz promótere szabályozza és laktózzal vagy annak analógjaival (IPTG) indukálható. Ebben az esetben szükséges, hogy DE3 típusú E. coli származékokat alkalmazzuk (BL21(DE3) vagy JM109(DE3)), amelyek tartalmazzák a T7 fág RNS polimeráz génjének kópiáját egy laktóz által indukálható promóter szabályozása alatt.

(3) Trc expressziós rendszer (Invitrogen BV) amelyben a fehérje szintézise a trc hibrid promóter szabályozása alatt történik. Ilyen promótert a trp promóter és a lac promóterek

összekombinálásával állíthatunk elő, és ez a különböző E. coli törzsekben laktóz vagy annak analógjai (IPTG) segítségével indukálható.

(4) Tac expressziós rendszer (Amersham Biosciences) amelyben a fehérje szintézise a tac promóter irányítása alatt történik. Ebben a rendszerben a fehérje szintézis az E. coli lacIq törzsekben (JM105 típus) laktóz vagy annak analógjai (IPTG) segítségével indukálható.

(5) PL expressziós rendszer, amelyben a fehérje szintézise a PL promóter irányítása alatt történik és triptofán hozzáadásával indukálható. Ebben az esetben olyan E. coli származékok (GI724) használata szükséges, amelyek a lambda fág cI represszor kódoló gént kópiáját tartalmazzák egy triptofánnal indukálható promóter szabályozása alatt.

1. lépés: Fermentáció és indukálás:

A leírás szerinti eljárás első lépése egy funkcionálisan módosított bakteriális törzs fermentációjából áll, amely törzs megegyezik az ezt megelőző Európai Szabadalomban (lásd fentebb) leírt törzzsel. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva mikroorganizmusként Escherichia coli származékot alkalmazunk, amelyet a humán PLGF gént tartalmazó expressziós plazmiddal módosítunk. Az előnyösen alkalmazható mikroorganizmus a [B12(DE3)pLysS PLGF-1] elnevezésű mikroorganizmus, amelyet a kereskedelemben beszerezhető törzsből [B12(DE3)pLysS] (Promega Corporation, Egyesült Államok) kapunk a humán PLGF-1 gén beépítésével. A találmány érvényességi köre azonban nem korlátozódik a humán PLGF-1 faktorra, hanem beleértendők az állati eredetű faktorok is (mint például majom, egér, nyúl, stb.). Ugyanakkor a találmány érvényességi köre nem korlátozódik E. coli származék alkalmazására sem, hanem beleértendő bármely genetikailag módosítható prokarióta mikroorganizmus alkalmazása is, amely képes heterológ fehérjéket expresszálni zárványtestek formájában.

A találmány szerinti eljárásban az oltóanyagként alkalmazott törzseket felhasználásuk előtt liofilizált formában tároljuk, hogy megőrizzük azok expressziós képességét. Felhasználás alkalmával a liofilizált anyagot ismét oldatba visszük megfelelő puffer alkalmazásával.

Bár a kereskedelemben a hatékonyan alkalmazható ismert tenyész táptalajok széles spektruma megtalálható, a találmány szerinti fermentációs lépést előnyösen olyan táptalajban végezzük, amely mentes bármely állati vagy emberi eredetű anyagtól annak érdekében, hogy megelőzzünk mindenféle fertőzési kockázatot. Élesztőkivonatok (Difco) - amelyeket egy vagy több megfelelő antibiotikummal egészítünk ki - a leginkább alkalmasak az eljáráshoz. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a következő táptalajt alkalmazzuk: steril körülmények között egy első oldatot (A) - amely élesztőkivonatot, glicerint és ammónium-szulfátot tartalmaz - egy második oldattal (B) keverünk össze, amely foszfát puffert tartal-

maz. A keverékhez ezt követően ampicillint és klóramfenikolt vagy ezekkel egyenértékű antibiotikumokat adunk hozzá. A megfelelő antibiotikum koncentrációk a következők: 50-300 µl/ml ampicillin, előnyösen 100-200 µg/ml ampicillin és 10-100 µg/ml klóramfenikol, előnyösen 30-40 µg/ml klóramfenikol.

A fermentációs lépést megelőzheti egy elő-oltóanyag lépés, amelyben a liofilizált mikroorganizmust a táptalajban felszuszpendáljuk és ezt követő inkubálási és hígítási lépéseknek vetjük alá, hogy a tenyészetben az optimális mennyiségű mikroorganizmus sejtet biztosítsuk. Előnyösen a mikroorganizmust egy éjszakán át inkubáljuk 37 oC-on, majd meghígítjuk és néhány órán keresztül tovább inkubáljuk. A megválasztott elő-oltóanyag térfogatot ezt követően lecentrifugáljuk, újra felszuszpendáljuk ampicillinnel kiegészített tenyész táptalajban, és a fermentációs térfogatot beoltjuk vele a fermentációs lépés végrehajtásához.

A fermentációt a fentebb említett, ampicillinnel és klóramfenikollal kiegészített táptalajban végezzük el a mikroorganizmusnak megfelelő hőmérsékleten, rendszerint 37 oC-on, oldott oxigén (O2) jelenlétében, amelynek százalékos aránya a levegővel történő telítéssel összevetve 20% és 40% között változhat, előnyösen 30%. A fermentáció pH értékét semleges vagy enyhén savas tartományban szabályozzuk (6,4 és 7,4 között). Továbbá, mivel a fermentációs eljárást keverés közben végezzük, előnyösen habzásgátló ágenseket is alkalmazunk.

A fermentáció előrehaladását a táptalaj optikai sűrűségének a növekedése kíséri. Ezen okból a találmány szerint az optikai sűrűség az a paraméter, amelyet a fermentáció során a fermentáció előrehaladásának mértékeként követünk. Különösen jól alkalmazhatók a 600 nm hullámhossznál végzett leolvasások.

A találmány szerinti eljárás lényeges jellemzője az elért magas sejtkoncentráció a tenyészetben az expresszió indukálásának idejére. Egy és ötven közötti, 600 nm-nél mért optikai sűrűségek (OD600) érhetők el a találmány szerinti tenyész táptalajjal. Azonban 18 OD értéknél magasabb optikai sűrűségek alkalmazhatók előnyösen, hogy a találmány szerinti eljárásra tipikus magas termelési szinteket elérjük. Különösen előnyösen alkalmazhatók a 16 és 20 OD közötti optikai sűrűség értékek a termelő bakteriális törzs indukciójához, hogy optimális eredményeket érjünk el. A fermentációt ezért tehát a fentebb leírt körülmények között tartjuk amíg a kívánt optikai sűrűség értékeket elérjük és utána indukáljuk a fehérje expressziót.

Bármely ágens vagy kémiai-fizikai körülmény - amely felhasználható az alkalmazott mikroorganizmusok sejtjeinek indukálására heterológ fehérje expresszió folyamatában - előnyösen alkalmazható a leírás szerint. Abban a speciális esetben, amikor a T7 fág promóterét tartalmazó expressziós plazmiddal módosított BL21(DE3)pLysS bakteriális törzset alkalmazzuk, az expressziót laktózzal vagy annak származékaival indukáljuk - mint például izopropil-

β-D-galaktopiranoziddal (IPTG) - megfelelő koncentrációban, nevezetesen 1 mM koncentrációban. Az indukció időtartama a szükségleteknek megfelelően változhat. Jó eredmények érhetők el néhány órás időtartamokkal, előnyösen 3-4 órás időtartamokkal, az optimális esetben az indukciót 3 óra 20 percen keresztül végeztük és az oldott oxigén százalékos mennyisége körülbelül 10% volt.

Sejtmintákat veszünk az indukció előtt és azt követően és ellenőrző analitikai eljárásokat végzünk rajtuk, mint például SDS-PAGE elektroforézist az indukció eredményének meghatározására.

Amikor a fehérje expresszió eléri a kívánt szintet, a tenyészetet lecentrifugáljuk és a sejteket átvisszük a következő lépésbe.

2. lépés: Extrakció és tisztítás:

Az expresszált heterológ fehérje a bakteriális törzsekben szegregálódik a sejtek belsejében önmagában, zárványtestek formájában. Ezért tehát a találmány szerinti eljárás módszereket biztosít a sejtek lízisére, az extrahált nukleinsav anyag (DNS) roncsolására és a zárványtestek mosására.

A sejteket a leírás szerint mossuk - bár ez nem feltétlenül szükséges - és megfelelő koncentrációban emulgeáló ágenseket tartalmazó oldatban felszuszpendáljuk - az emulgeáló ágens előnyösen Triton X100 lehet 0,5% és 1% közötti koncentrációban - majd ezt követően elvégezzük a sejtmembrán lízisét. A lízis folyamata elvégezhető fagyasztás/felengedés, French Press, szonikálás vagy más hasonló, a technika állása szerint ismert eljárás segítségével. Azonban a BL21(DE3)pLysS bakteriális törzs esetében az előnyösen alkalmazható módszer a fagyasztás/felengedés módszere, amely egyúttal a találmány szerinti előnyös megvalósítási mód is és ezt legalább két egymást követő cikluson keresztül megismételjük. A mechanikai lízist követően a lízises lépést néhány percig tovább folytatjuk a lízis oldatban szobahőmérsékleten, keverés közben.

A zárványtestek felszabadulását a lízis közegbe követi a mikroorganizmus különböző komponenseinek és sejtalkotóinak a felszabadulása, mindenek előtt a nukleinsav természetű anyagok felszabadulása. Ezek az anyagok kölcsönhatásba léphetnek és veszélyeztetik az itt következő fehérje tisztítási folyamatot. Ezért tehát a lízis során kapott szuszpenzióban/oldatban elvégezzük az ilyen nukleinsav természetű anyagok - közelebbről meghatározva a DNS – roncsolását enzimes ágensek, mint például DN-áz segítségével (ez lehet természetes eredetű vagy rekombináns, mint például a Benzonáz), kémiai ágensek segítségével, mint például deoxikólsav, vagy fizikai-mechanikai ágensek segítségével, mint például szonikálás vagy nagyenergiájú keverés segítségével vágóéleket alkalmazva, mint például egy mixer esetében. A

DNS roncsolását - amelyet például mixerben hajtunk végre - olyan lizált sejteken végezzük el, amelyeket kelátképző és detergáló ágenseket tartalmazó mosóoldat megfelelő térfogatában újra-szuszpendálunk, ahol az említett ágensekként EDTA és Triton X100 alkalmazható. Előnyösen ezt a lépést több cikluson keresztül megismételjük, előnyösen két cikluson keresztül, amit hígítási lépések követnek a mosóoldatban, majd centrifugáljuk és a felülúszót eldobjuk annak érdekében, hogy eltávolítsuk a zárványtesteket tartalmazó frakcióból a sejtkomponenseket és sejtes anyagokat.

3. lépés: A fehérje renaturálása (újra-feltekerése):

A PLGF-1 tisztított zárványtesteket tartalmazó frakciót ezt követően denaturáló pufferben szolubilizáljuk, amely a technika állása szerint ismert denaturáló ágenseket tartalmaz, mint például karbamid, guanidin-izotiocianát, guanidin-hidroklorid. Előnyösen denaturáló oldatként denaturáló koncentrációjú karbamid oldatot alkalmazunk, például 8 M koncentrációban. Annak érdekében, hogy meggyorsítsuk a szolubilizálási folyamatot, a frakciót előnyösen homogenizáljuk vagy szonikáljuk. A zárványtestek szolubilizálása után az oldatot ugyanezen denaturáló pufferrel hígítjuk, míg körülbelül 0,8 OD optikai sűrűség értéket érünk el 280 nm hullámhossznál mérve (0,8 OD280). Ezt követően az oldatot tovább hígítjuk hígító pufferrel, míg 0,5 OD280 értéket kapunk. Az előnyösen alkalmazható hígító oldatok sókat és polietilén glikolt (PEG) tartalmaznak és bázikus pH-val rendelkeznek (körülbelül 8,0). A PLGF-1 fehérje renaturációját a meghígított oldatban úgy végezzük el, hogy az oldathoz oxidáló/redukáló párok megfelelő koncentrációját adjuk hozzá, amelyet 10-30 órás inkubálás követ, előnyösen 18-20 órás inkubálás 10 oC és 30 oC között, előnyösen 20 oC-on keverés közben. Az ilyen párokra például szolgálhatnak a következők: cisztin/cisztein, cisztamin/cisztearmin, 2-hidroxi-etil-diszulfid/2-merkapto-etanol. Előnyösen alkalmazható oxidáló/redukáló párra például szolgálhat a glutation annak oxidált és redukált formáiban, sorrendben megfeleltetve 0,1 mM és 2,5 mM közötti koncentrációban (előnyösen 0,5 mM) és 0,25 mM és 6,25 mM közötti koncentrációban (előnyösen 1,25 mM). A renaturáció következtében a lényegében monomer formában expresszált PLGF-1 fehérje részben a dimer formába hozható vissza (5. ábra).

4. lépés: Anioncserélő kromatográfia:

A megelőző lépésből kapott oldatot - előnyösen centrifugálás és/vagy szűrést követően - amely a fehérjét főleg monomer és részben dimer formában tartalmazza, anioncserélő gyantára visszük fel annak érdekében, hogy a keverékben megnöveljük a dimer forma arányát és megtisztítsuk a bakteriális szennyezőktől. Bármely a kereskedelemben beszerezhető, anioncserélő kromatográfiára alkalmas mátrix egyaránt alkalmazható, azzal a kikötéssel, hogy kapacitási, felviteli és áramlási sebesség tulajdonságai hasonlóak a Q-Sepharose Fast Flow

(Amersham Biosciences) gyanta esetén tapasztalhatókhoz, és mellette jól alkalmazható ipari folyamatokban is. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint eljárva magas átfolyóképességű gyantát alkalmazunk, mint például Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) gyantát vagy azzal egyenértékű mátrixot. A gyantát alacsony ionerősségű oldatokkal mossuk és egyensúlyba hozzuk. Az ilyen oldatokra például szolgálhat etanolamin-HCl pH 8,5 értékkel, amelynek sótartalma alacsony vagy egyáltalán nem tartalmaz sót. Ugyanezen oldat alkalmazható a tisztításra váró fehérje keverék felvitelére, megkötésére és mosására. A felhasznált gyanta lehetővé teszi nagy térfogatú fehérje oldatok felvitelét, ahol a felviteli térfogat / oszloptérfogat arányok 1:1 és 10:1 között változhatnak. Előnyösen a 10:1 arány közeli térfogatarányok alkalmazhatóak, mert ezek lehetővé teszik az oszlop kihasználtságának az optimalizálását. Azonban a 10:1 fölötti arányok elkerülendőek, mert a mátrix megkötő képességének telítődése miatt ezek a dimer formában megtalálható fehérje magasabb veszteségét okozzák.

Míg a monomer formában található PLGF-1 fehérje már átjut az alacsony ionerősségű oldatokkal végzett mosás során, a dimer és multimer formák elúcióját a kiinduló oldat ionerősségének növelésével érjük el. Ilyen megnövelést értünk el oly módon, hogy az ekvilibráló oldatot növekvő és előre meghatározott százalékos mértékben 1 M NaCl-t tartalmazó második oldattal keverjük össze. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a dimer formában található fehérjét 15% és 25% közötti mennyiségben 1 M NaCl-t tartalmazó oldatokkal eluáljuk, amely 150 mM és 250 mM közötti NaCl koncentrációknak felel meg. A találmány legjobb megvalósítási módja szerint eljárva a fehérjét izokratikus körülmények között eluáljuk 200 mM NaCl koncentrációnál. A különböző anyagok elúcióját automatikusan követjük az optikai abszorpciót mérve 280 nm hullámhossznál (2. ábra). A dimer formában található PLGF-1 fehérjét tartalmazó összegyűjtött frakciókat ezt követően SDS-PAGE elektroforézissel ellenőrizzük (5. ábra). Előnyösen a teljes kromatográfiás folyamatot automatizálva végezzük komputerizált rendszer segítségével, amely megfelelő szoftverprogram kontrollja alatt működik, mint például a Software FPLC Director rendszer (Amersham Biosciences).

5. lépés: Fordított fázisú kromatográfia:

A megelőző lépésből származó frakciókat, amelyek az aktív formában feldúsult PLGF-1 fehérjét tartalmazzák, megfelelő pufferrel kihígítjuk és fordított fázisú kromatográfiás oszlopra visszük fel annak érdekében, hogy tovább tisztítsuk a fehérjét az aktív formában. A felvitt oldat mennyisége 4,5-5,5 közötti OD280 értéknek felel meg a kromatográfiás mátrix milliliterére számolva. Az ilyen mennyiségeket maximális mennyiségnek tekinthetjük.

Bármely, a kereskedelemben hozzáférhető, a kívánt alkalmazásnak megfelelő kromatográfiás mátrix felhasználható, azzal a megkötéssel, hogy annak felviteli kapacitás és áramlá-

si sebesség tulajdonságai megfelelnek a folyamat igényeinek. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva olyan gyantát alkalmazunk, amelynek szemcseméret garantálja az abszorpciós képesség legjobb kihasználását az oszloptöltés egyszerűségének egyidejű megvalósulása mellett. Az ilyen mátrixokra például szolgálhatnak az RP Source 15 vagy az RP Source 30 gyanták (Amersham Biosciences). Az összes egyensúlyba hozó, felviteli, gyanta mosó és elúciós oldatok vizes-szerves oldatok, amelyek különböző százalékos mennyiségben tartalmaznak szerves oldószert. Az ilyen oldatokra például szolgálhatnak etanolt, metanolt vagy acetonitrilt tartalmazó oldatok. Előnyösen vizes-alkoholos oldatokat alkalmazunk, amelyek növekvő százalékos mennyiségben tartalmaznak etanolt. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva két puffer oldat megfelelő mennyiségeit keverjük össze, ahol az első A puffert tartalmaz, azaz például 40% etanolt és 0,1% TFA-t (trifluor-ecetsav), a második B puffert tartalmaz, azaz például 70% etanolt és 0,1% TFA-t.

A gyantára felvitt fehérje anyagot megfelelően mossuk és utána eluáljuk egy elúciós módszer szerint eljárva, amelynek során két egymást követő lépést alkalmazunk, ahol szerves oldószer növekvő gradiensét tartalmazó eluáló oldatokat használunk. Az első lépést a szerves oldószer emelkedő gradiense mellett végezzük, amíg megkapjuk a monomer forma elúciós csúcsát. Ilyen gradienst előállíthatunk oly módon, hogy a B puffert az A pufferhez adjuk 4% és 40% közötti százalékos tartományban, amikor minden egyes eluált oszloptérfogattal a B puffer aránya 3 százalékkal nő. Ahogy megjelenik a fehérje monomer formájának megfelelő elúciós csúcs, az elúciót izokratikus körülmények között folytatjuk, míg elfogy a monomer formának megfelelő elúciós csúcs. Az így beállított izokratikus körülmények biztosítják a monomer és a dimer formának megfelelő két kromatográfiás csúcs legnagyobb lehetséges szétválasztását és így a legjobb elérhető felbontást egy ipari és nem analitikai típusú folyamatra nézve. A második lépést ismét szerves oldószer növekvő gradiense mellett végezzük, amíg megtörténik a fehérje teljes elúciója, főleg a dimer formában. Ebben a második lépésben a gradienst úgy érjük el, hogy a B puffert az A pufferhez adjuk 10% és 100% közötti százalékos tartományban, amikor minden egyes eluált oszloptérfogattal a B puffer aránya 40,9 százalékkal nő. A PLGF-1 fehérje különböző formáinak elúcióját automatikusan követjük az optikai abszorpció mérésével 280 nm-nél (3. és 4. ábra). A PLGF-1 fehérjét lényegében dimer formában tartalmazó összegyűjtött frakciókat ezt követően SDS-PAGE elektroforézis segítségével ellenőrizzük (5. ábra). Előnyösen a teljes fordított fázisú kromatográfiás folyamatot automatizálva végezzük komputerizált rendszer segítségével, amely megfelelő szoftverprogram kontrollja alatt működik, mint például a Software FPLC Director rendszer (Amersham Biosciences).

Az elektroforézis eredmények azt mutatják, hogy a fordított fázisú kromatográfia második lépésében kapott PLGF-1 fehérje nagymértékben tisztított aktív formában van, nevezetesen a fehérjét dimer és részben multimer formában tartalmazza, de lényegében mentes a monomer forma szennyeződésektől. Az így kapott termék legalább 98,5% aktív formát tartalmaz, előnyösen legalább 99,5% mennyiséget, míg legalább 70% dimer formában található. A monomer forma maradéka nem több, mint 1,5%. Az aktív formában található fehérjét átlagosan 160 mg/liter baktérium tenyészet mennyiségben nyerjük ki. A fentebb leírt módszer szerint nyert tiszta fehérje további feldolgozási lépésekbe vihető, mint például membránon történő ultraszűrés. Ebben az esetben a terméket olyan membránon ultraszűrjük, amelynek levágási küszöbértéke kisebb, vagy egyenlő 30 kDa molekulatömeggel és az anyagot diafiltrációnak vetjük alá TFA segítségével megsavanyított vízzel szemben 1:106 hígítási faktorig. Az így kapott végterméket megfelelően formulázhatjuk liofilizálási segédanyagok segítségével és liofilizáljuk, hogy megtartsuk a legjobb biológiai aktivitást.

A találmány szerinti eljárást az alábbiakban példák segítségével ismertetjük, azonban az itt közölt példák csupán illusztrációnak tekintendők és semmiképpen sem korlátozzák a találmány érvényességi körét.

1. példa

Fermentáció

A következő eljárás a fermentációs módszerhez és a genetikailag módosított mikroorganizmus ("Micro-Organism Genetically Modified" MOGM) [BL21(DE3)pLysS PLGF-1] indukciójához kapcsolódik fermentációs készülékben 1 mM IPTG alkalmazása mellett.

Anyagok:

SBM oldat, amely a következőket tartalmazza:

A oldat (1 literre számolva)	
Bacto élesztő kivonat (Difco)	34 g
ammónium-szulfát	2,5 g
glicerin	100 ml
H2O (amennyi elegendő)	900 ml
B oldat (10x) (100 ml-re számolva)	
KH2PO4	1,7 g
K2HPO4 x 3 H2O	20 g, vagy
K2HPO4	15,26 g
H2O (amennyi elegendő)	100 ml

Az A és B oldatokat egymástól elkülönítve autoklávozzuk és felhasználáskor keverjük össze steril körülmények között. Alternatív módon eljárva az A és B oldatokat összekeverjük és steril körülmények között szűrjük.

Az IPTG 200 mM (200x) oldat előállításhoz 5 g tiszta anyagot oldunk 100 ml desztillált vízben. Az oldatot 0,22 μm szűrőn át megszűrjük, kisebb részegységekre osztjuk és lefagyasztjuk -20 oC-on.

Az alkalmazott habzásgátló ágens az Antifoam O-10 (nem szilikonos) (Sigma katalógus szám: A-8207).

Az alkalmazott baktériumtörzs a [BL21pLysS PLGF-1 WCB] (WCB, "working cell bank", munka sejtbank).

Elő-oltóanyag:

Egy csö liofilizált, genetikailag módosított mikroorganizmust (MOGM) WCB vesztünk ki és felszuszpendáljuk 1 ml SBM oldatban, amely tartalmaz még 100 μg/ml ampicillint és 34 μg/ml klóramfenikolt.

A szuszpenziót 30 ml SBM oldatban kihígítjuk, amely tartalmaz még 100 μg/ml ampicillint és 34 μg/ml klóramfenikolt.

A szuszpenziót 37 oC-on inkubáljuk egy éjszakán keresztül. Az ezt követő napon az éjszakán át inkubált tenyészet 30 ml térfogatát 800 ml SBM oldatban - amely tartalmaz még 100 μg/ml ampicillint és 34 μg/ml klóramfenikolt - meghígítjuk és ezután 4 egyliteres Erlenmeyer lombikba osztjuk szét, amelyek mindegyike így 200 ml-t tartalmaz.

Az egyes lombikok tartalmát 37 oC-on inkubáljuk 24 órán keresztül. A 4 lombik tartalmát összekeverjük és leolvassuk az OD600 értéket oly módon, hogy 1/20 arányban vízzel meghígítjuk (50 μl + 950 μl víz).

Az elö-oltóanyag kiszámított térfogatát ezután 10 percig 7500 g mellett 4 oC-on centrifugáljuk steril csövekben.

A baktériumot ezt követően újra-szuszpendáljuk 20 ml SBM oldatban amely tartalmaz még 200 μg/ml ampicillint és 10 μg/ml klóramfenikolt. A fermentáció minden literére 20 ml ilyen szuszpenziót veszünk és az oldatot 420 ford/perc mellett kevertetjük szobahőmérsékleten 20 percen keresztül. Ezzel egyidejűleg előkészítjük a fermentációs készüléket és kalibráljuk az oxigén mérőfejeket.

Az oxigén mérőfejeket 37 oC-on kalibráljuk először 0%-nál nitrogénnel, majd 100%-nál levegővel habzásgátló nélkül 600 ford/perc keverés mellett.

A fermentációt a következő kísérleti körülmények között végezzük el:

Táptalaj: SBM oldat, amely tartalmaz még 200 μg/ml ampicillint és 10 μg/ml kloramfenikolt;

Hömérséklet: 37 oC;

Oldott O2 százalékos értéke: 30% (a levegővel való telítésre vonatkoztatva);

pH: 6,4 és 7,4 között;

Habzásgátló: 1:10 arányban hígítva vízzel, erős kevertetés közben adjuk hozzá 140 μl per 750 ml táptalaj mennyiségben.

Indukálás:

Az indukálást a következő kísérleti körülmények között végezzük el:

Az indukálás OD600 értéke: 16-20 között;

Indukáló ágens: IPTG 1 mM végső koncentrációban;

Oldott O2 százalékos értéke: 10% (a levegővel való telítésre vonatkoztatva);

Indukálás hossza: 3 óra 20 perc.

Közvetlenül az indukálást megelőzően 20 μl baktérium szuszpenziót veszünk ki, 80 μl vizet adunk hozzá és félretesszük az indukció előtti ellenőrzéshez.

Az indukálás időpontjában IPTG-t adunk a fermentációhoz 1 mM végső koncentrációban.

Az oldott oxigén százalékos mennyiségét 10 százalékra állítjuk be.

Az indukálás végén leolvassuk a végső OD600 értéket és lemérjük az összes térfogatot.

Ezt követően 10 μl baktérium szuszpenziót veszünk ki és 90 μl vizet adunk hozzá, majd félretesszük az indukálás utáni ellenőrzéshez.

Az indukálást SDS-PAGE elektroforézis segítségével ellenőrizzük oly módon, hogy a két ezt megelőzően felforralt mintából 20-20 μl-t viszünk fel a gélre.

Az indukált baktériumot tartalmazó táptalajt ezután centrifugáljuk 7500 g mellett 10 percig, vagy 3000 g mellett 25 percig 4 oC-on és a felülúszót eltávolítjuk.

Eredmények: Az indukálás eredményét SDS-PAGE elektroforézis segítségével ellenőrizzük az 1. ábrán bemutatott módon.

2. példa

A zárványtestek extrakciója és tisztítása

A következő eljárás a PLGF-1 zárványtestek előállítására és újra-feltekeredésére vonatkozik. A PLGF-1 bakteriális fehérje az újra-feltekerés következtében részlegesen visszahozható a dimer formába.

Anyagok:

Megfelelő kapacitással rendelkező mixer.

Lízis oldat: 1 mM Mg2SO4 + 20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1% Triton X100.

Mosó oldat: 0,5% Triton X100 + 10 mM EDTA pH 8,0.

BD (denaturáló puffer): 8 M karbamid, 50 mM Tris pH 8,0, 20 mM etiléndiamin.

Az egyes komponenseket feloldjuk és vízzel a kívánt térfogatra hozzuk.

Oxidált glutation 200x: 100 mM vízben.

Redukált glutation 200x: 250 mM vízben.

Hígító puffer: 600 µM végső PEG 4000 koncentráció (2,4 g/l), 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM NaCl.

Habzásgátló: Antifoam O-10 (nem szilikonos) Sigma.

A PLGF-1 zárványtestek előállítása.

A lízis és a mosó oldatokat szobahőmérsékleten (RT) egyensúlyba hozzuk.

Két fagyasztásos - felengedéses ciklust hajtottuk végre -80/37 oC-on.

A bakteriális üledéket minden 450 OD600 mennyiségű baktériumra számítva 1 ml lízis oldatban lizáltuk.

Ezt követően szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig keverés közben (250 ford/perc).

Az oldatot megfelelő kapacitású mixerbe öntjük és minden 450 OD600 mennyiségű baktériumra számítva 3 ml mosóoldatot adunk hozzá.

Kívánt esetben 0,4 µl hígítás nélküli habzásgátlót adunk hozzá a minta minden milliliterére számítva.

Az oldatot maximális sebességgel mixeljük 1 percig, illetve addig, míg a minta kellőképpen homogén.

A mixer tartalmát ezután megfelelő kapacitású tárolóedénybe visszük át és minden 450 OD600 mennyiségű baktériumra számítva 6,5 ml mosó oldatot adunk hozzá. 45 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten keverés közben.

Az így kapott szuszpenziót 13000 g mellett centrifugáljuk 45 percig 25 oC-on és a felülúszót eldobjuk.

A leülepedett csapadékot minden 450 OD600 mennyiségű baktériumra számítva 4 ml mosó oldatban újra-szuszpendáljuk és ezt a ciklust a mixerben másodszor is megismételjük.

A szuszpenziót megfelelő kapacitású tárolóedénybe visszük át, minden 450 OD600 mennyiségű baktériumra számítva 6,5 ml mosó oldattal meghígítjuk és 30 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten keverés közben.

A fenti körülmények között a centrifugálást megismételjük és a felülúszót eldobjuk.

3. példa

A fehérje renaturálása

A zárványtesteket 7 ml BD denaturáló pufferben szolubilizáltuk (a puffer 8 M karbamidot tartalmaz) és tovább hígítottuk BD pufferben 0,8 OD280 értékig. Ezt követően 0,6 térfogat hígító puffert adtunk hozzá annak érdekében, hogy a végső karbamid koncentrációt 5 M értékre állítsuk be.

Ezt követően 1/200 redukált glutation 200x (végső koncentrációja 1,25 mM) és 1/200 oxidált glutation 200x (végső koncentrációja 0,5 mM) adtunk hozzá. Ellenőrzésre 15 µl mintát vettünk ki (Prerefol) és az oldatot ezután 20 oC-on inkubáljuk 18-20 órán keresztül keverés közben.

Az inkubálás végén a közeget 10 percig centrifugáljuk 10000 g mellett 20 oC-on, 0,45 vagy 0,8 µm filteren leszűrjük és 15 µl mintát veszünk ki ellenőrzés céljából (Postrefol).

Eredmények: Az újra-feltekerést megelőző és azt követő oldatokból vett 15 µl térfogatú mintákat SDS-PAGE elektroforézis segítségével analizáljuk (5. ábra).

4. példa

Anioncserélő kromatográfia

Az alább következő eljárás a PLGF-1 fehérje tisztításának az első lépésére vonatkozik az újra-feltekerést követően. Miután a mintát az oszlopra felvittük, a meg nem kötődött PLGF-1 monomer nagy része elvész. A felvitt mennyiség nem lépheti túl a az oszloptérfogat tízszeresét, mivel ez jelentős veszteséget okozna a PLGF-1 dimerben.

Az elúciót izokratikus körülmények között végezzük 20% B puffer mellett (lásd alább), amely 200 mM NaCl koncentrációnak felel meg. Az eluált csúcs még mindig tartalmazza az újra-feltekeréshez használt glutationokat, amelyek körülbelül az OD280 50 százalékát adják.

Anyagok és körülmények:

FPLC rendszer: Amersham Biosciences cég, a készüléket az FPLC Director szoftver kezeli.

Monitorozási körülmények:

UV: 280 nm hullámhossz, a skála végkitérése 2

Hőmérséklet: 20 oC, (minimum 15 oC és maximum 25 oC)

Gyanta: Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences)

Oszloptérfogat, oszlopmagasság: Térfogata egytizede a felvitelre kerülő mintának, magassága 13-16 cm között.

Egyensúlyba hozás: Két oszloptérfogat ("Column Volume", CV) B puffer, majd 1,5 CV A puffer.

Minta: Renaturált, centrifugált és/vagy szűrt PLGF-1. Ne vigyünk fel többet, mint 10 oszloptérfogat mintát!

A puffer: 20 mM etanolamin-HCl pH 8,5.

B puffer: A puffer + 1 M NaCl.

Injektálási áramlási sebesség: 1 cm/perc (a maximális vizsgált sebesség kis oszlopokon 1,887 cm/perc volt, a minimális vizsgált sebesség 0,5 cm/perc volt).

Elúciós áramlási sebesség: 1 cm/perc (a maximális vizsgált sebesség kis oszlopokon 1,887 cm/perc volt, a minimális vizsgált sebesség 0,5 cm/perc volt).

Mosások az injektálás után: 1,5 oszloptérfogat 0% B pufferrel.

Gyűjtött csúcsok: A 20% B pufferrel, izokratikus körülmények között végzett elúcióban kapott csúcs, amely körülbelül 3 oszloptérfogatot tett ki.

Végső mosás: 2 oszloptérfogat 100% B puffer mellett.

Módszer:

Begyűjtjük a 20% B pufferrel, izokratikus körülmények között végzett elúcióban kapott csúcsot, majd utána 0,271 oszloptérfogat vizet, 0,0045 oszloptérfogat TFA-t és 0,225 oszloptérfogat etanolt adunk hozzá. Ezen a módon a minta végül 1,5-szörös mértékben felhígul és 15% etanolt valamint 0,3% TFA-t tartalmaz. Ennek a két anyagnak a hozzáadása elősegíti a PLGF-1 kötődését a fordított fázisú gyantához (leírását lásd az 5. példában).

Eredmények: A kromatográfiás lépést folyamatosan követjük az optikai sűrűség 280 nm-nél végzett monitorozásával, ahogyan ezt bemutatjuk a 2. ábrán.

Az izolált fehérjetermészetű anyag tisztaságát SDS-PAGE elektroforézis segítségével analizáljuk (5. ábra).

5. példa

Fordított fázisú kromatográfia

A következő eljárást hajthatjuk végre RP Source gyantával, amelynek átlagos részecske átmérője 15 mikron vagy 30 mikron. Azonban a 30 mikron szemcseméretű RP Source gyanta - bár nem változtatja meg semmiféleképpen a tisztítási folyamatot - lehetővé tesz egy gazdaságos megtakarítást a gyantán magán (körülbelül 50%), jelentősen egyszerűsíti az oszlop töltési folyamatát és alacsonyabb oszlopellenállást mutat.

Az eljárás a PLGF-1 fehérje tisztításának a második lépését képezi a QFF gyantán történő átbocsátás után. A minta felvitele során magas abszorbancia mutatkozik és ez megfelel a

meg nem kötődött glutationok csúcsának, amelyek nem tapadnak fel a gyantára. Ez a folyamat két további lépésből áll, az elsőt RPCmon néven azonosítjuk és a PLGF-1 monomer komponensének a döntő többsége eltávolítására szolgál, míg a második a fehérje lényegében dimer komponensének az elúciójára szolgál és ezt RPCdim néven azonosítjuk.

Az első további lépés (RPCmon):

Anyagok és körülmények:

FPLC rendszer: Amersham Biosciences cég, a készüléket az FPLC Director szoftver kezeli.

Monitorozási körülmények:

UV: 280 nm hullámhossz, a skála végkitérése 0,05

Hőmérséklet: 20 oC, (minimum 15 oC és maximum 25 oC)

Gyanta: Fordított fázisú (RP) Source 30 (Amersham Biosciences)

Oszloptérfogat, oszlopmagasság: Térfogata egyötöde-egyhatoda a felvitelre kerülő mintának, magassága 27-33 cm között.

Egyensúlyba hozás: Két oszloptérfogat ("Column Volume", CV) B puffer, majd 2 CV A puffer.

Minta: A megelőző lépésből származó PLGF-1 (4. példa), amelyet 1,5-szörösre hígítottunk és 15% etanolt, valamint 0,3% TFA-t tartalmaz. A maximális felvitel 4,5-5,5 OD280 a gyanta minden milliliterére.

A puffer: 40% etanol + 0,1% TFA

B puffer: 70% etanol + 0,1% TFA

Injektálási áramlási sebesség: 1,887 cm/perc

Elúciós áramlási sebesség: 1,887 cm/perc

Mosások az injektálás után: 1,5 oszloptérfogat 4% B pufferrel.

Monomer csúcs: 4%-40% gradiens a B pufferrel 12 oszloptérfogatban (3% B puffer emelkedés per oszloptérfogat). Közvetlenül a csúcs elúciójának megkezdődése után, amikor az OD280 a teljes skála 25 százalékát éri el, az elúciót izokratikus körülmények között folytatjuk az ebben az időben elért B puffer koncentrációjának megtartásával, míg a csúcs elúciója teljes lesz (körülbelül 2,5-3,5 oszloptérfogat).

Műveletek:

A "monomer" csúcsnak megfelelő oldatból kellő mennyiséget veszünk és koncentráljuk ellenőrzéshez (Mon az 5. ábrán).

A második további lépés (RPCdim):

Anyagok és körülmények:

Az oszlop újabb egyensúlyba hozása nélkül - csupán az UV monitor skálatartományát csúsztatjuk el a 2 OD értékig - a B pufferrel egy 10% - 100% gradiens tartományt hozunk létre 2,2 oszloptérfogatban (40,9% B puffer emelkedés per oszloptérfogat).

Müveletek:

A "dimer" csúcsnak megfelelő frakciókat gyűjtjük össze. A 4. ábra mutatja be ennek példáját. A frakciókat összegyűjtjük és lemérjük térfogatukat valamint az optikai sűrüségüket 280 nm hullámhossznál.

A liofilizálás előtt kapott teljes kitermelést (amit milligrammban fejezünk ki) úgy számoljuk ki, hogy megszorozzuk az OD280 értéket a térfogattal és a higítással. Az így kapott kitermelés átlagos értéke 164 mg tiszta PLGF-1 a bakteriális tenyészet literjére számolva, ahol a standard deviáció értéke 23,21 volt. Ez a mennyiség kifejezhető mg per 1000 OD600 értékben is a fermentált baktériumra vetítve, ami 5,58 mg tiszta PLGF-1 fehérjét jelent a fermentált baktérium 1000 OD600 mennyiségére, ahol a standard deviáció értéke 0,8 volt.

Az így kapott dimer oldatot -20 oC-on tartjuk az ultra-diaszürés és a liofilizáció elvégzéséig. Ezekből az oldatokból egy-egy mintát viszünk SDS-PAGE elektroforézisre, ahogyan ezt az 5. ábrán bemutatjuk.

P0500029

MEGADÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás rekombináns placenta eredetű növekedési faktor (PLGF) extrakciójára és tisztítására – nem több mint 1,5% monomer formát magában foglaló – dimer és multimer formát tartalmazó aktív formában oly módon, hogy módosított prokarióta sejtekben indukálható expressziós rendszer alkalmazásával expressziót végzünk, azzal jellemezve, hogy:

(1) a prokarióta sejteket fermentációba visszük;

(2) a zárványtesteket extraháljuk és tisztítjuk;

(3) az expresszált fehérjét renaturáljuk;

(4) ioncserélő kromatográfiát végzünk;

(5) fordított fázisú kromatográfiát végzünk;

amelynek során az (1) lépésben a fermentációt addig folytatjuk, míg a tenyész táptalaj optikai sűrűsége 14-50 közé esik 600 nm hullámhossznál (OD^{600} 14-50) és ezt követi az indukció; a (2) lépésben végrehajtjuk a tenyésztett sejtek lízisét, roncsoljuk a DNS-t és izoláljuk a zárványtesteket; a (3) lépésben a zárványtesteket denaturáló pufferben szolubilizáljuk és az expresszált fehérjét - legalábbis részben - visszahozzuk a dimer formába; a (4) lépésben az expresszált fehérje dimer és multimer formáit elválasztjuk a monomer formától anioncserélő kromatográfia alkalmazásával; valamint az (5) lépésben az expresszált fehérje dimer és multimer formáit még jobban elválasztjuk a monomer formától fordított fázisú kromatográfia segítségével két egymást követő elúciós lépést alkalmazva szerves oldószer növekvő gradiense mellett, amely két lépést egy izokratikus körülmények között végrehajtott lépés választ el, és a fehérjét végül izoláljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy placenta eredetű növekedési faktorként humán PLGF-1-et vagy állati eredetű PLGF-et állítunk elő.

3. Az 1. vagy 2. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy prokarióta sejtekként bakteriális sejteket alkalmazunk.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (1) lépést olyan táptalajban végezzük, amely lehetővé teszi magas baktérium koncentráció elérését a fermentációs lépésben, és mentes minden állati vagy emberi eredetű anyagtól.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (1) lépést olyan táptalajban végezzük, amely egy vagy több szelekciós ágenst, élesztő kivonatot, glicerint és ammónium sókat tartalmaz.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy indukálható expressziós rendszerként a T7 expressziós rendszert alkalmazzuk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy bakteriális sejtként E. coli eredetű törzset alkalmazunk.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy baktérium törzsként az E. coli {BL21(DE3)pLysS} törzset alkalmazzuk.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziót laktózzal, izopropil-β-D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) vagy ezekkel funkcionálisan ekvivalens analógokkal indukáljuk.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az indukció időpontjában a tenyészet optikai sűrűsége 600 nm hullámhosszon mérve 14-30 OD (14-30 OD^{600}), előnyösen 16-20 OD (16-20 OD^{600}).

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (1) lépésben előzetes elő-beoltásos lépést is végrehajtunk.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (2) lépésben a sejt lízist fagyasztás/felengedés módszerével, „French Press" alkalmazásával, vagy más, ezekkel egyenértékű módszerrel hajtjuk végre.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (2) lépésben a DNS-roncsolást kivont vagy rekombináns eredetű DN-ázzal, előnyösen benzonázzal vagy kémiai-mechanikai behatással végezzük.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (2) lépésben a DNS roncsolást mixer alkalmazásával végezzük.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (2) lépésben a zárványtestek izolálását legalább két centrifugálási ciklus és megfelelő pufferrel történő mosás alkalmazásával végezzük.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (3) lépésben a zárványtesteket karbamidot, guanidin-izotiocianátot, guanidín-hidrokloridot vagy bármely más denaturáló ágenst tartalmazó denaturáló pufferben szolubilizáljuk, és kívánt esetben homogenizáljuk vagy szonikáljuk.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (3) lépésben a zárványtestek szolubilizálása után az oldatot kihígítjuk és a fehérje természetű anyagot renaturáljuk az oldathoz oxidáló/redukáló ágenseket adva és az oldatot 10-30 órán keresztül inkubálva, előnyösen 18-20 órán keresztül inkubálva 10 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen 20 °C hőmérsékleten keverés közben.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldatot addig hígítjuk, míg 0,01-2 közötti optikai sűrűséget, előnyösen 0,5 értéket érünk el 280 nm hullámhosszon

mérve (OD^{280}) és az alkalmazott oxidáló/redukáló ágens redukált és oxidált glutation, olyan arányok és koncentrációk mellett, amelyek lehetővé teszik a dimer forma maximális mértékű kialakulását.

19. Az 1-18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (4) lépésben a megelőző lépésből származó oldatot anioncserélő oszlopra visszük fel, ahol a felvitt térfogat / oszloptérfogat arány 1:1 és 10:1 közé esik.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a felvitt térfogat / oszloptérfogat arány 10:1.

21. A 19. vagy a 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérjét etanolamin-HCl, NaCl pufferrel eluáljuk, és a monomer formában található fehérje főleg azokban a frakciókban lelhető fel, amelyek a gyantához nem kötődő anyagot tartalmaznak, míg a dimer formában található fehérje lényegében az ezt követő frakciókban lelhető fel, amelyek 150-250 mM NaCl koncentrációnál eluálódnak.

22. Az 1-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (5) lépésben a megelőző lépésből származó, 150-250 mM NaCl koncentrációknál eluálódó oldatot meghígítjuk, és fordított fázisú kromatográfiás oszlopra visszük fel olyan mennyiségben, amely gyanta milliliterenként 4,5-5,5 OD optikai sűrűségűnek felel meg, 280 nm hullámhosszon mérve.

23. Az 1. és 22. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az első elúciós lépést szerves oldószer növekvő gradiensében végezzük amíg megjelenik a monomer forma elúciós csúcsa, utána az elúciót izokratikus körülmények között folytatjuk, míg a monomer forma elúciós csúcsa elfogy, és a második lépést szerves oldószer növekvő gradiense mellett végezzük, amíg a főleg dimer formában található fehérje teljes elúciója megtörténik.

24. A 22. vagy 23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elúciós puffer etanolt, metanolt vagy acetonitrilt tartalmaz.

25. A 22-24. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elúciós puffer vizes-alkoholos oldat, amely növekvő százalékban tartalmaz etanolt.

26. A 22-25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fordított fázisú kromatográfiát 30 mikron átlagos részecskeméretű gyantán végezzük.

27. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy további, ultraszűréses lépést is végrehajtunk, majd azt követően liofilizálunk, megfelelő segédanyagok jelenlétében vagy azok hiányában.

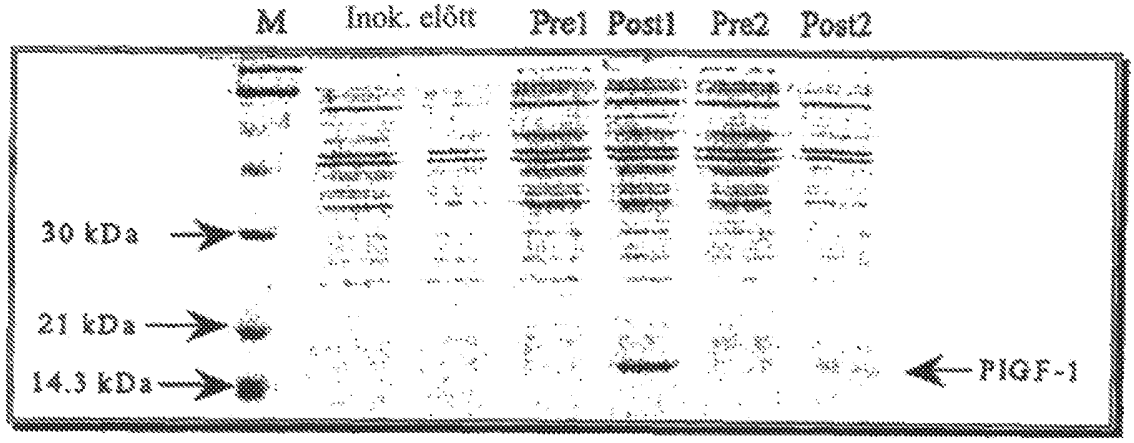
28. Aktív formában található placenta eredetű növekedési faktor, amely az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alkalmazásával állítható elő, és amely növekedési faktor mentes a gazdaszervezetből eredő szennyeződésektől, a monomer formát nem több, mint 1,5%-ban tartalmazza és lényegében dimer és multimer formában található.

A meghatalmazott:
DANUBIA
Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.

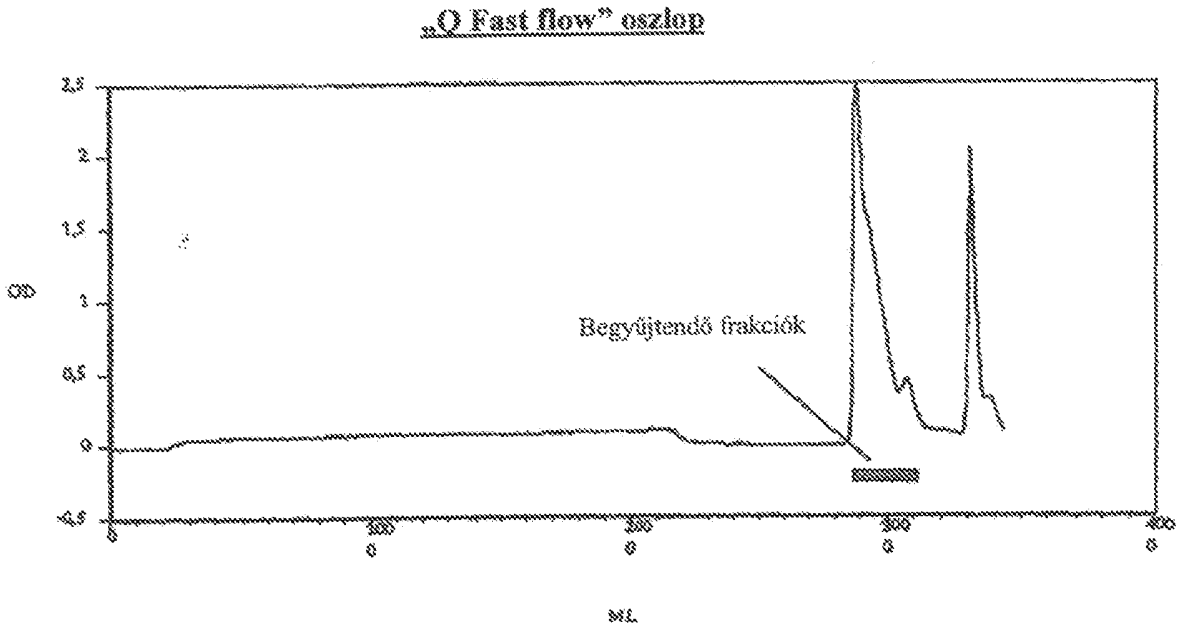
dr. Petkó Árpád
szabadalmi ügyvivő

P50029

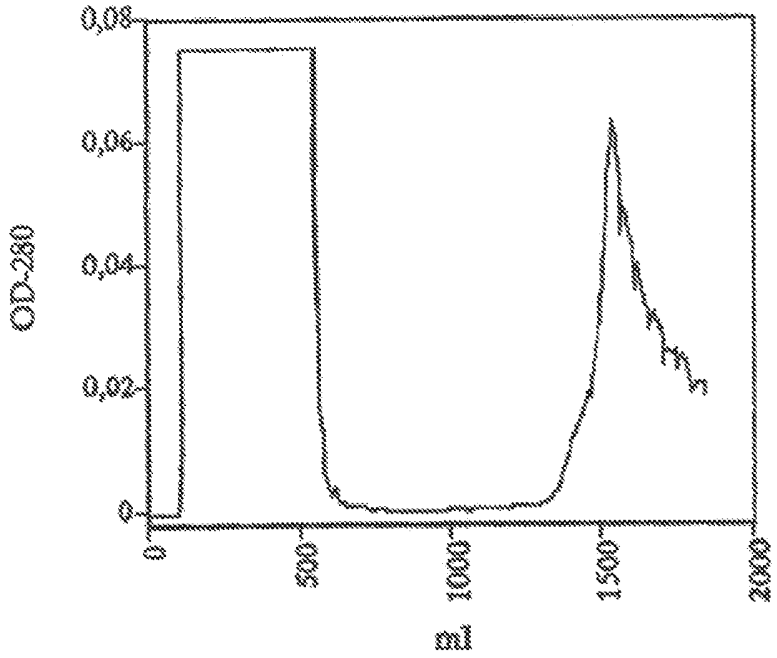
1. ábra



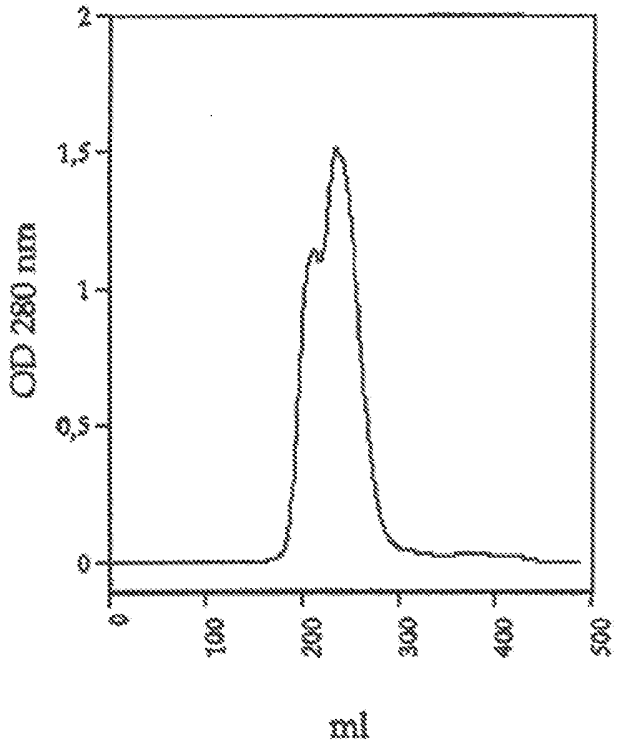
2. ábra


„Q Fast flow" oszlop
OD
Begyűjtendő frakciók
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
0
300
0
300
0
300
0
300
0
mL

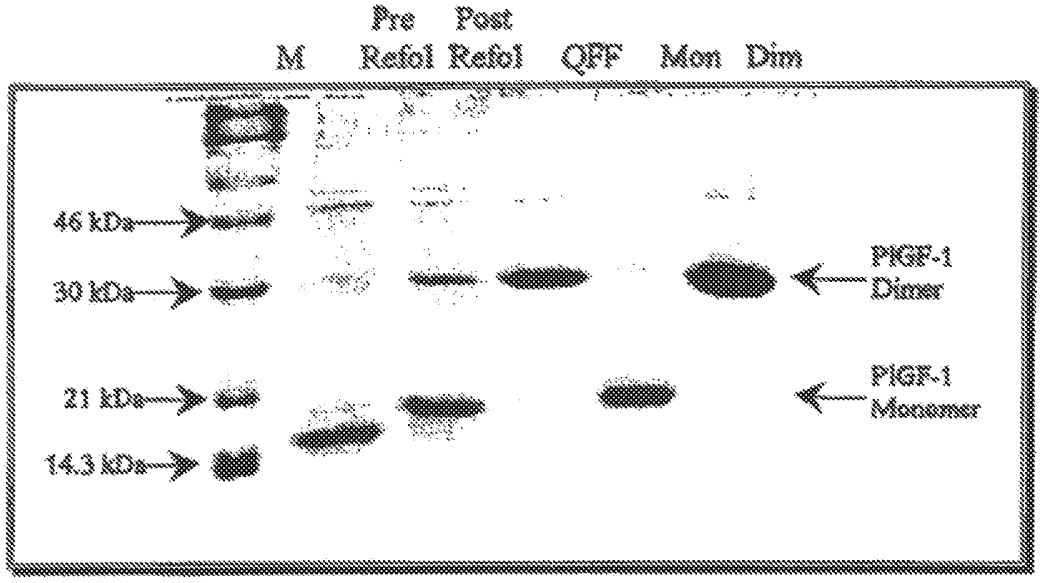
3. ábra



4. ábra



5. ábra


M
Pre Refol
Post Refol
QFF
Mon
Dim
46 kDa
30 kDa
21 kDa
14.3 kDa
PlGF-1 Dimer
PlGF-1 Monomer