

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/475 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02828331.7

[45] 授权公告日 2010 年 2 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100588661C

[22] 申请日 2002.2.5 [21] 申请号 02828331.7

[86] 国际申请 PCT/IT2002/000065 2002.2.5

[87] 国际公布 WO2003/066676 英 2003.8.14

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.26

[73] 专利权人 盖莫纳股份公司

地址 意大利阿纳尼

[72] 发明人 D·玛格里尼 M·巴缇斯特

E·康缇 G·萨尔维亚 M·图斯

[56] 参考文献

US5922846 1999.7.13

US5708148 1998.1.13

Recombinant production of PlGF - 1 and its activity in animal models. Domenico Maglione *, Mauro Battisti, Marina Tucci. Il Farmaco, Vol. 55 . 2000

胎盘生长因子与妊娠. 刘伟. 国外医学. 妇产科学分册, 第 6 期. 2000

审查员 马 岚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程 泳

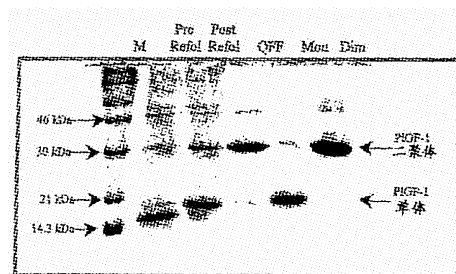
权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 5 页

[54] 发明名称

重组胎盘生长因子的制备方法

[57] 摘要

提取和纯化在诱导型原核表达系统中表达的重组胎盘生长因子(PLGF)的方法包括下列步骤: I) 细菌细胞的发酵, II) 内含体的提取和纯化, III) 表达蛋白的复性, IV) 离子交换层析, V) 反相层析。



1. 一种通过在修饰的原核细胞中的诱导型表达系统中表达而提取和纯化二聚体和多聚体活性形式存在的并且含有不超过 1.5%单体形式的重组胎盘生长因子的方法，包括下列步骤：I) 该原核细胞的发酵，II) 内含体的提取和纯化，III) 所表达蛋白的复性，IV) 离子交换层析，V) 反相层析，其特征在于实施步骤(I)直到培养基在 600nm 的光密度达到 14 至 50，随后诱导；步骤(II)包括裂解培养细胞，使 DNA 断裂和分离内含体；在步骤(III)中，内含体溶于变性缓冲液中并使表达蛋白至少部分恢复为二聚体形式；在步骤(IV)中，二聚体和多聚体形式的表达蛋白通过阴离子交换层析与单体形式分开；在步骤(V)中，二聚体和多聚体形式的表达蛋白通过反相层析进一步与单体形式分开并最终分离，其中所述反相层析之后还有两个有机溶剂梯度逐渐增加的洗脱阶段，并且这两个洗脱阶段之间为等度洗脱条件下的洗脱阶段。

2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于胎盘生长因子是人 PLGF-1 或是动物来源的。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其特征在于该原核细胞是细菌细胞。

4. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于步骤 I 在允许发酵步骤中获得高细菌密度并且不含任何动物或人来源的物质的培养基中实施。

5. 根据权利要求 4 的方法，其特征在于步骤 I 在含一种或多种选自选择试剂，酵母提取物，甘油和铵盐的组分的培养基中实施。

6. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于诱导型表达系统是表达系统 T7。

7. 根据权利要求 3 的方法，其特征在于细菌细胞是源自大肠杆菌的菌株。

8. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于细菌菌株是大肠杆菌

BL21 (DE3) pLysS。

9. 根据权利要求6的方法,其特征在于通过乳糖或异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷来诱导表达。

10. 根据权利要求1的方法,其特征在于诱导时培养物在600 nm的光密度是14-30 OD。

11. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤I包括预接种的预备步骤。

12. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤II中,通过冻/融或弗氏压碎器实施细胞裂解。

13. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤II中,通过提取或重组来源的DNase,或通过化学-机械作用来使DNA断裂。

14. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤II中,通过混合器来使DNA断裂。

15. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤II中,通过至少两个循环的离心和洗涤进入合适的缓冲液来分离内含体。

16. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤III中,内含体溶于含尿素、异硫氰酸胍、盐酸胍或其它任何变性试剂的变性缓冲液中并任选进行匀浆或超声处理。

17. 根据权利要求1的方法,其特征在于步骤III中,内含体溶解之后,稀释该溶液并向该溶液中添加氧化/还原剂,并在温度10℃至30℃,于搅拌下孵育10至30小时,从而使蛋白物质复性。

18. 根据权利要求17的方法,其特征在于稀释该溶液直到280nm的光密度达到0.01至2,并且氧化/还原剂是谷胱甘肽,其氧化型和还原型的比例和浓度允许最大限度地形成二聚体形式。

19. 根据权利要求1的方法,其特征在于在步骤IV中,来自前面步骤的溶液装入阴离子交换柱上,装载体积/柱体积的比率为1:1至10:1。

20. 根据权利要求19的方法,其特征在于装载体积/柱体积的比率是10:1。

21. 根据权利要求 19 的方法, 其特征在于用乙醇胺-HCl、NaCl 缓冲液洗脱蛋白质, 单体形式的蛋白主要包含在含不结合于树脂的物质的馏分中, 而二聚体形式的蛋白主要包含在用 150 至 250mM 浓度的 NaCl 洗脱的随后馏分中。

22. 根据权利要求 21 的方法, 其特征在于步骤 V 中, 前述步骤中于 150 至 250mM NaCl 浓度处洗脱的溶液被稀释并以相当于每毫升树脂中 280nm 光密度为 4.5 至 5.5OD 的量装入反相层析柱上。

23. 根据权利要求 22 的方法, 其特征在于在有机溶剂梯度逐渐增加的条件下实施第一洗脱阶段直到出现单体形式洗脱峰, 在等度洗脱条件下继续洗脱直到单体形式洗脱峰耗尽, 在有机溶剂梯度逐渐增加的条件下实施第二阶段直到主要是二聚体形式的蛋白完全洗脱。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其特征在于洗脱缓冲液含有乙醇、甲醇或乙腈。

25. 根据权利要求 23 的方法, 其特征在于洗脱缓冲液是含百分比不断增加的乙醇的水醇溶液。

26. 根据权利要求 22 的方法, 其特征在于在直径中值为 30 微米的颗粒的树脂上实施反相层析。

27. 根据权利要求 1 的方法, 包括额外的超滤步骤, 其后为在存在或缺乏适当添加剂情况下的冷冻干燥。

28. 通过权利要求 1-24 中任一项的方法可获得的活性形式的胎盘生长因子, 其特征在于它是纯的, 不含宿主菌株的污染物且它含有百分比不高于 1.5% 的单体形式, 并且主要是二聚体和多聚体形式。

重组胎盘生长因子的制备方法

发明领域

本发明涉及从基因修饰的细胞提取和纯化重组胎盘生长因子的方法。

背景技术

胎盘生长因子(PLGF)是具有与血管内皮生长因子(VEGF)类似结构的同二聚糖蛋白。Maglione 和 Persico 在要求 1990 年 9 月 27 日的意大利优先权的专利 EP-B-550 519 (WO-A-92/06194)中描述了编码 PLGF 蛋白的完整多核苷酸序列。剪接 PLGF 的 ARN 的不同过程产生三个同源形式的胎盘生长因子,明确地是 PLGF-1, PLGF-2 和 PLGF-3,其具有不同的多肽序列,全部在文献中描述。

上面提及的专利也描述了制备 PLGF 因子的方法,包括使用以被表达载体修饰的宿主细胞为特征的诱导型原核表达系统,在该载体中,人 PLGF 基因被整合在诱导型启动子(直接或间接)的控制下。在适当活化剂诱导 PLGF 表达后,培养该细胞,分离并接受裂解。

这样获得的粗溶解产物是含少量被表达的 PLGF 蛋白并具有低特异活性的蛋白的复杂混合物。事实上,在已知方法中,在含低细胞密度的培养中诱导蛋白表达,诱导时低光学密度在 600 nm 处明显是 0.2 和 0.6 OD 之间。此外,在前述文件中所述方法不包括表达蛋白的另外纯化阶段。由于这个原因,根据申请 WO-A-92/06194 获得的溶解产物本身不适合直接用于制备药物。

Maglione 等在"II Farmaco"55 (2000), 165 - 167 页设想了纯化相同胎盘因子的更复杂方法。然而,该方法公开内容仅给出了已知适用技术的简单列表,没有描述其条件和实验细节,而这些是获得制药用途所需纯度和数量的 PLGF 蛋白所必需的。

本发明的范围提供了提取和纯化在细菌细胞中表达的重组 PLGF

的新方法，允许获得具有适合工业应用于制备药物的高水平纯度和产量的 PLGF。

本发明的更多范围是获得基本上活性形式(高于 98.5%)的 PLGF 蛋白，主要包括二聚体(不低于 70%)和多聚体形式，并且含有不高于 1.5%的单体形式的残余物(很少或无活性)。

发明内容

本发明基于确定了尤其适合提取和纯化在细菌细胞中表达的人 PLGF 的纯化技术的顺序。本发明进一步基于确定了单一技术和待纯化物质的化学-物理特征的最佳操作条件。

接着，本发明的目的是提取和纯化依靠诱导型原核表达系统表达的重组胎盘生长因子(PLGF)的方法，包括步骤：I)细菌细胞的发酵，II)内含体的提取和纯化，III)表达蛋白的复性，IV)离子交换层析，V)反相层析，和任选 VI)超滤、配制和冷冻干燥的最后阶段。根据这种方法，在进行诱导步骤之前，实施发酵(步骤 I)直到获得培养基中高细菌密度，其中这种高细菌密度由培养基中高光学密度表明。步骤(II)包括细菌裂解、DNA 破裂和内含体分离。表达蛋白的复性(步骤 III)是通过内含体溶解于变性缓冲液，和转化至少部分表达蛋白为二聚体形式获得的。最后，在步骤(IV)和(V)中，二聚体和多聚体形式的表达蛋白与单体形式分开并以纯化形式分离，随后超滤和在通常冷冻干燥和配制添加剂存在下进行冷冻干燥。

本发明的特殊目的是上面提及的提取和纯化人源 PLGF-1 蛋白的方法，但是对动物来源的 PLGF-1 也基本有效。

要求保护的方法有利地允许获得比根据现有技术所述方法获得的产量高 30-50 倍的表达蛋白产量。要求保护的方法还允许获得非常纯的蛋白，具有高特异活性和基本上是二聚体形式。

本发明的另一目的是依靠本发明的方法可获得的活性胎盘生长因子，其不含任何残余蛋白或其它细菌污染物且含有的单体形式残余物不高于 1.5%。

Maglione 等在在先专利 EP-B-0550519 (WO-A-92/06194)中描述

了细菌宿主细胞的基因修饰。为了这个目的，导入含对应于编码 PLGF-1 因子的人基因的插入物的表达载体以转化细菌细胞。文献中已知该完整基因序列并且可以自由获得。含这种序列的质粒保藏在 ATCC，保藏号 ATCC NO 40892。在 T7 噬菌体的 RNA 聚合酶系统控制下并用 IPTG（异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷）诱导实施表达。

然而，可以利用其它诱导型原核表达系统。市场上可获得的这种系统的实例由以下代表：

1) pBAD 表达系统(In vitrogen BV), 其中蛋白合成置于 araBAD 启动子控制下且可以依靠阿拉伯糖在不同大肠杆菌菌株中诱导。

2) T7 表达系统(In vitrogen BV 或 Promega), 其中蛋白合成受 T7 噬菌体的 RNA 聚合酶启动子控制且可以依靠乳糖或其类似物 (IPTG) 诱导。在这种情况下，需要使用大肠杆菌衍生物 DE3 (BL21 (DE3) 或 JM109 (DE3)) 型，即含有乳糖诱导型启动子控制下的 T7 噬菌体的 Rna 聚合酶的基因拷贝。

3) Trc 表达系统(In vitrogen BV), 其中蛋白合成置于 trc 杂合启动子控制下。这种启动子可以通过解链 trp 启动子和 lac 启动子而获得，并可以依靠乳糖或其类似物 (IPTG) 在不同大肠杆菌菌株中诱导。

4) Tac 表达系统(Amerham biosciences), 其中蛋白合成置于 tac 启动子控制下。在这个系统中，依靠乳糖或其类似物 (IPTG) 在大肠杆菌菌株 lacIq (JM105 型) 中诱导蛋白合成。

5) P_L 表达系统，其中蛋白合成置于 P_L 启动子控制下，可以通过添加色氨酸诱导。在这种情况下，需要使用含色氨酸诱导型启动子控制下 λ 噬菌体 cI 抑制剂的编码基因拷贝的大肠杆菌衍生物 (GI724)。

步骤 I: 发酵和诱导

要求保护的方法的第一阶段由发酵与在先欧洲专利（上面）中所述菌株等同的功能性修饰的细菌菌株组成。在优选实施方案中，该微生物是大肠杆菌的衍生物，被含 PLGF 人基因的表达质粒修饰。优选的微生物是称作 [B12 (DE3) pLysS PLGF-1] 的一个，由人 PLGF-1 基因整合入市场上可获得的菌株 [B12 (DE3) pLysS] (Promega

Corporation USA)中获得。然而,本发明不限于人 PLGF-1 因子,也涉及动物来源(猴子、小鼠、兔子等)的。本发明不限于使用大肠杆菌衍生物,而是包括使用易于进行基因修饰并能够表达内含体形式的异源蛋白的任何原核微生物。

本发明方法中利用作为接种物的菌株在使用它们前保存为冷冻干燥形式以维持其表达能力。使用时,通过利用适当缓冲液,冷冻干燥物质再放入溶液中。

尽管有广泛的市场上可获得且可以有效使用的已知培养基,但是为了避免任何感染风险,优选在不含任何动物或人来源物质的培养基中实施根据本发明的发酵步骤。添加一种或多种合适抗生素的酵母提取物(Difco)代表该方法的最合适手段。在优选实施方案中,使用通过在无菌条件下含酵母提取物、甘油和硫酸铵的第一溶液(A)与含磷酸盐缓冲液的第二溶液(B)混和而获得的培养基。接着该混合物与氨苄青霉素和氯霉素或等价抗生素结合。适当的抗生素浓度是 50 至 300 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素,优选 100 至 200 $\mu\text{g/ml}$ 以及 10 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素,优选 30 至 40 $\mu\text{g/ml}$ 。

发酵步骤前可以进行预接种步骤,其中冷冻干燥的微生物悬浮于培养基中并进行连续培养和稀释步骤,旨在使培养体系中具有最佳数量的微生物细胞。优选地,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养该微生物,接着再稀释和培养几个小时。随后离心所选预接种体积,再次悬浮于富含氨苄青霉素的培养溶液中并在发酵容器中孵育进行发酵步骤。

在添加氨苄青霉素和氯霉素的上面提及培养基中,于适合该微生物的温度下,通常在大约 37 $^{\circ}\text{C}$,在溶解 O_2 百分比为 20% 至 40%,优选 30% (相对于空气饱和度)存在下实施发酵。发酵期间,pH 保持在中性或弱酸性值(6.4-7.4)。此外,由于在搅拌下进行发酵过程,因此优选使用防泡剂。

发酵过程中,培养基的光密度增加。由于这个原因,光密度是根据本发明可利用的参数以监测发酵进展程度。在 600nm 的读数特别合适。

本发明的主要特征是表达诱导时培养体系中达到的高细胞密度。由于本发明培养基的原因，在 600nm 的光密度 (OD600) 可以达到 1 至 50。然而，优选高于 18 的密度以获得要求保护的方法典型的高产量水平。特别优选 16 和 20 之间的密度以诱导该制备型细菌菌株并得到最佳结果。接着，发酵保持在上面提及的条件下，直到获得这种光密度值，接着进行诱导蛋白表达。

可以有益地利用能够在使用的微生物细胞中诱导异源蛋白表达机械的任何试剂或化学-物理条件。在具体情况下，其中使用了用含 T7 噬菌体启动子的表达载体修饰的细菌菌株 BL21 (DE3) pLysS 时，用适当浓度即大约 1mM 的乳糖或其衍生物，如异丙基- β -硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。根据需要诱导持续时间可以变化。几个小时的时间可以获得好的结果，优选 3 至 4 个小时；在最佳方法中，通过使用大约等于 10% 的溶解 O₂ 百分比，诱导保持 3 个小时 20 分钟。

于诱导前后取细胞样品并接受对照技术分析如 SDS-PAGE 电泳，来确定诱导结果。

当蛋白表达达到期望水平时，离心培养物，取出细胞进行下列步骤。

步骤 II: 提取和纯化

细菌菌株中表达的异源蛋白以内含体形式隔离于细胞中。因此，本发明的方法提供了细胞裂解、核酸提取材料 (DNA) 的破裂和内含体的回收和洗涤。

洗涤细胞 (尽管不是必须) 并悬浮于含适当浓度乳化剂的溶液，优选 0.5%-1% 浓度的 Triton X100，接着它们进行细胞膜的裂解。可以依靠冻/融、弗氏压碎器，超声处理或其它类似已知技术实施裂解过程。然而，对于细菌菌株 BL21 (DE3) pLysS 的优选方法是冻/融方法，在最优选实施方案中，该冻/融方法重复至少两个连续循环。机械裂解之后，裂解阶段在裂解溶液中室温搅拌下持续几分钟。

裂解培养基中内含体的释放伴随着微生物不同成分和细胞物质的释放，以及核酸材料。这些物质可干扰和危害随后蛋白纯化方法。因

此, 依靠酶试剂, 如 DNase (天然或重组酶如 Benzonase), 化学试剂, 如脱氧胆酸, 或物理-机械试剂, 如超声处理或依靠叶片进行高能量搅拌, 例如在混和器中, 来打断这种核酸材料, 特别是 DNA, 从而对裂解获得的悬浮液/溶液进行处理。DNA 的破裂, 例如在混和器中实施, 是对重悬于含螯合剂和洗涤剂 (例如 EDTA 和 Triton X100) 的适当体积洗涤溶液的裂解细胞实施。优选在洗涤溶液中重复更多循环, 优选 2 次, 可选择地可以增加稀释步骤, 离心和除去上清, 以除去内含体的馏分中的成分和细胞物质。

步骤 III 蛋白的复性 (重折叠)

含纯化的 PLGF-1 内含体的馏分接着溶于含已知变性试剂如尿素、异硫氰酸胍、盐酸胍的变性缓冲液中。优选, 变性溶液是变性浓度为例如 8M 的尿素溶液。为了加速溶解过程, 该馏分可以有益地接受匀浆化或超声处理。溶解内含体之后, 用相同变性缓冲液稀释溶液直到获得在 280nm 测定为大约 0.8 (OD₂₈₀ 0.8) 的光密度。随后, 用稀释缓冲液进一步稀释该溶液直到 0.5 OD₂₈₀。合适的稀释溶液含有盐和聚乙二醇(PEG)并具有碱性 pH (大约 8)。PLGF-1 蛋白在稀释溶液中的复性通过向该溶液添加适当浓度的氧化/还原对, 随后在搅拌下于 10-30°C (优选 20°C) 孵育 10 至 30 小时, 优选 18-20 小时而完成。这种对的实例是: 胱氨酸/半胱氨酸, 胱胺/半胱胺, 2-羟基乙基二硫化物/2-巯基-乙醇。氧化/还原对的优选实例是氧化和还原形式的谷胱甘肽, 分别以 0.1 mM 和 2.5 mM (优选 0.5 mM) 之间和 0.25 mM 和 6.25 mM (优选 1.25 mM) 之间的浓度。依靠复性, 主要以单体形式表达的 PLGF-1 蛋白部分恢复成二聚体形式 (图 5)。

步骤 IV: 阴离子交换层析

将主要含单体形式蛋白以及部分二聚体形式蛋白的来自前面步骤的溶液 (优选经过离心和/或过滤步骤) 装入阴离子交换树脂上, 以富集二聚体形式的化合物和从细菌污染物中纯化之。同样可以使用适合阴离子交换层析的任何市场上可获得的基质, 只要其容量、填料和流速的特征类似于 Q Sepharose Fast Flow 树脂 (Amersham

biosciences), 并适合于工业方法。在优选实施方案中, 使用高流动树脂, 例如 Q Sepharose Fast Flow 树脂 (Amersham biosciences) 或等同物。洗涤该树脂并用具有低离子强度的溶液平衡。这种溶液的实例包括具有低或无盐含量的乙醇胺-HCl (pH8.5)。可以利用相同溶液进行装入、吸收和洗涤待纯化的蛋白混合物。使用的树脂允许装入大体积蛋白溶液, 装入体积/柱体积的比率从 1: 1 至 10: 1 变化。优选接近 10: 1 的体积/体积比率, 因为它们使柱的使用优化。然而, 要避免高于 10: 1 的比率, 因为由于基质吸附容量的饱和, 它们导致二聚体形式蛋白的高度损失。

鉴于低离子强度洗涤阶段中单体形式的 PLGF-1 蛋白已经过滤掉, 因此通过增加起始溶液的离子强度达到二聚体和多聚体形式的洗脱。这种增加是通过平衡溶液与增加的和预先建立的百分比的含 NaCl 1M 的第二溶液混和而完成的。在优选实施方案中, 用含 15% 至 25% NaCl 1M (相当于 150 至 250mM NaCl) 的溶液洗脱二聚体形式的蛋白。在最佳实施方案中, 在 200mM NaCl 浓度的等度洗脱条件下洗脱该蛋白。通过测定 280nm 的吸光度来自动监测各物质的洗脱 (图 2)。随后 SDS-PAGE 电泳来控制所收集的含二聚体形式 PLGF-1 蛋白的馏分 (图 5)。有益地, 用合适程序控制下操作的计算机化系统来自动实施整个层析过程, 例如软件 FPCL Director system (Amersham biosciences)。

步骤 V: 反相层析

收集富含活性形式的 PLGF-1 蛋白的来自前面步骤的馏分, 用适当缓冲液稀释, 并装入反相层析柱上, 以进一步纯化活性形式的蛋白。装入溶液的量相应于每毫升层析基质 4.5 和 5.5 之间的 OD280 值。认为这种量是最大量。

可以利用任何适合于本发明用途的市场上可获得的层析基质, 只要其装入容量和流速特征与该方法所需条件相容。在优选实施方案中, 使用这样的树脂, 即其珠大小能保证最佳利用吸附能力并易于装填柱本身。这种基质的实例是 RP Source 15 或 RP Source 30 (Amersham

biosciences)树脂。所有平衡、装入、树脂洗涤和洗脱的溶液是氢化有机溶液，其含有不同百分比的有机溶剂。这种溶液的实例是包含乙醇、甲醇或乙腈的溶液。优选，利用含不断增加的百分比的乙醇的氢化-醇溶液。在本发明的实施方案中，混和适当量的两种缓冲溶液，前者包括缓冲液 A，即乙醇 40 % 和 TFA（三氟醋酸）0.1%，后者包括缓冲液 B，即乙醇 70 % 和 TFA 0.1%。

装入树脂上并适当洗涤的蛋白物质接着通过洗脱过程洗脱，包括两个连续阶段，其中利用了含梯度不断增加的有机溶剂的洗脱溶液。在梯度升高的有机溶剂的条件下实施第一个阶段直到获得单体形式的洗脱峰。这种梯度可以通过向缓冲液 A 添加 4 % 至 40 % 的缓冲液 B 而获得，对于每个洗脱柱体积，缓冲液 B 增加比例是 3 %。相当于单体形式蛋白的洗脱峰一出现，在等度洗脱条件下持续洗脱直到单体形式洗脱峰耗尽。如此设置的等度洗脱条件可以最大可能地分开对应于单体和二聚体形式的层析峰，进而获得具有最佳可获得分辨率的工业方法，而不是分析型方法。再次在梯度不断增加的有机溶剂条件下实施第二个阶段直到完成主要是二聚体形式的蛋白的完整洗脱。在第二个阶段中，梯度是通过向缓冲液 A 中添加 10 % 至 100 % 的百分比的缓冲液 B 获得的，对于每个洗脱柱体积，缓冲液 B 的增加比例是 40.9 %。通过测定 280nm 的吸光度自动监测各种形式 PLGF-1 蛋白的洗脱（图 3 和图 4）。随后由 SDS-PAGE 电泳控制含主要含二聚体形式 PLGF-1 蛋白的馏分（图 5）。有益地，用合适程序控制下操作的计算机化系统自动实施整个反相层析过程，例如软件 FPCL Director system (Amersham biosciences)。

电泳结果表明从第二阶段反相层析获得的 PLGF-1 蛋白是高纯度活性形式，即它包括二聚体和部分多聚体形式，但它基本不含单体形式的任何污染物。如此获得的产物包括至少 98.5% 的活性形式，优选至少 99.5%，其中至少 70 % 是二聚体形式。单体形式的残留物不高于 1.5%。每升细菌培养物获得平均 160mg 量的活性形式蛋白。根据上述方法获得的纯蛋白可以接受另外的处理阶段如膜超滤。在这种情况下，

在具有低于或等于 30kD 截留值的膜上过滤产物并对 TFA 酸化水进行渗滤，直到达到 1: 106 的稀释系数。如此获得的终产物可以与冷冻干燥添加剂适当配制并冷冻干燥以保持其最好的生物活性。

附图说明

图 1: 该图显示了监测步骤 I 在还原条件下电泳 SDS-PAGE 获得的结果。Prel 和 Pre2 代表诱导前检查，如下制备。诱导前不久，取 600nm (OD600) 下吸光度为 0.064 单位的物质并用水稀释 5 倍。取 20 μ l 这种稀释液，添加至 20 μ l 还原缓冲液并煮沸。20 μ l 这种最终溶液加样到 SDS PAGE 基质上。Post1 和 Post2 代表诱导后检查，如上制备。M 表示分子量标记的混合物。在诱导后柱 (Post1 和 Post2) 中，就在分子量指示 14.3 的上面记录一个条带，在诱导前柱 (Prel 和 Pre2) 中基本缺乏这一条带，其相应于表达和隔离于内含体中的 PLGF-1 蛋白。

图 2: 该图显示了 Q-Sepharose Fast Flow 树脂上阴离子交换层析的监测层析谱。X-轴表示洗脱体积 (ML)，y-轴表示吸光度单位 (OD)。用 20% 缓冲液 B (NaCl 200 mM) 洗脱获得的第一个洗脱峰对应于基本上二聚体形式的 PLGF-1 蛋白，但是它包括杂质和单体形式。用 100% 缓冲液 B (NaCl 1M) 洗脱的随后的峰含有被除去的杂质。

图 3: 该图显示了在 RP Source 30 树脂上反相层析的第一个洗脱阶段的监测层析谱。X-轴表示洗脱体积 (ml)，y-轴表示吸光度单位 (OD)。第一个大量洗脱峰对应于各种杂质，它不结合树脂。第二个洗脱峰对应于在等度洗脱 (isochratic) 条件 (实验发现在大约 10 - 15% 缓冲液 B 处) 下洗脱的单体形式 PLGF 蛋白。

图 4: 该图显示了在 RP Source 30 树脂上反相层析的第二个洗脱阶段的监测层析谱。X-轴表示洗脱体积 (ml)，y-轴表示吸光度单位 (OD)。洗脱峰对应于二聚体 - 多聚体形式的 PLGF 蛋白。

图 5: 该图显示了全过程最后监测的 SDS-PAGE 上电泳获得的结果。Prerefol 和 Postrefol 代表表达蛋白复性 (步骤 III) 之前和之后的检查。QFF 代表从 Q Sepharose Fast Flow 树脂洗脱的峰，主要含有

二聚体形式的蛋白。Mon 代表含单体形式的峰。Dim 代表在 RP Source 30 树脂上反相层析的第二分步中洗脱的峰。应该注意在复性前，表达蛋白主要是单体形式。复性后，部分蛋白是二聚体形式。通过 QFF 和 RF 30 层析的下列纯化允许获得具有高纯度的 PLGF-1 蛋白。

下面依靠实施例描述本发明，然而，实施例仅仅举例说明，没有限制的目的。

实施例 1: 发酵

下列步骤涉及发酵和使用 1mM IPTG 诱导发酵容器中基因修饰的微生物(MOGM) [BL21 (DE3) pLysS PLGF-1]的方法。

材料:

溶液 SBM 由下列组成:

溶液 A (每 1 升)

Bacto 酵母提取物(Difco) 34 g

硫酸铵 2.5 g

甘油 100 ml

H₂O 约 900 ml

溶液 B(10 X) (每 100 ml)

KH₂PO₄ 1.7 g

K₂HPO₄·3H₂O 20 g, 或

K₂HPO₄ 15.26 g

H₂O 加适量至 100 ml

溶液 A 和 B 分开高压消毒并在无菌条件下混和使用。可供选择地，在无菌条件下混和溶液 A 和 B 并过滤。

通过 5g 纯物质溶于 100ml 蒸馏水制备 IPTG 200mM(200X)。依靠 0.22μm 过滤器过滤该溶液，细分成等分部分并冰冻在 -20℃。

利用的防泡剂是 Antifoam O-10 (非硅) Sigma Cat A-8207。

使用的细菌菌株是[BL21pLysS PLGF-1 WCB] (工作细胞库)。

预接种: 取一管冷冻干燥的基因修饰的微生物(MOGM) WCB 并悬浮于 1 ml 的 SBM + 100μg/ml 氨苄青霉素 + 34μg/ml 氯霉素中。

悬液稀释于 30ml 的 SBM + 100 μ g/ml 氨苄青霉素 + 34 μ g/ml 氯霉素中。

悬液在 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (O/N)。第二天, 30 ml O/N 培养物稀释于 800ml 的 SBM + 100 μ g/ml 氨苄青霉素 + 34 μ g/ml 氯霉素中, 并且它们细分到 4 个 1 升 Erlenmeyer 瓶, 每瓶含 200ml。

每瓶内容物在 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。混和 4 瓶内容物, 通过 1/20 稀释于水 (50 μ l + 950 μ l 水) 中读取 OD600。

已建立体积的预接种物接着在 4 $^{\circ}$ C, 无菌管中, 以 7.500 x g 离心 10 分钟。

接着通过在 420rpm 室温搅拌 20 分钟将细菌重悬于每升发酵物 20ml 的 SBM + 200 μ g/ml 氨苄青霉素 + 10 μ g/ml 氯霉素中。同时, 准备发酵容器并校准氧探头。

在 37 $^{\circ}$ C 温度用氮气将氧探针校定为 0%, 接着无防泡剂以及 600rpm 搅拌下用空气将探针校定为 100%。

在下列实验条件下实施发酵:

培养基: SBM + 200 μ g/ml 氨苄青霉素 + 10 μ g/ml 氯霉素

温度: 37 $^{\circ}$ C

溶解 O₂ %: 30 % (相对于空气饱和度)

pH: 从 6.4 至 7.4

防泡剂: 1: 10 稀释于水中; 以每 750ml 培养基 140 μ l 的量添加它之前强烈搅拌。

诱导:

在下列条件下实施诱导:

诱导物的 OD600: 16 - 20

诱导剂: IPTG, 终浓度 1mM

溶解 O₂ %: 10 % (相对于空气饱和度)

诱导时间: 3 小时 20 分钟。

就在诱导前, 取 20 μ l 细菌, 添加到 80 μ l 水中并进行诱导前检查。

诱导时, IPTG 添加至终浓度 1mM。

溶解 O2 百分比是 10 %。

诱导末期，读取最终 OD600 并测定整体体积。

接着，取 10 μ l 细菌，添加到 90 μ l 水中并进行诱导后检查。

通过加 20 μ l 的 2 个预先煮沸的样品进行 SDS-PAGE 电泳以控制诱导。

接着含诱导细菌的培养基在 4℃以 7.500 x g 离心 10 分钟，或 3000 x g 离心 20 分钟并除去上清。

结果：SDS-PAGE 电泳检查诱导结果，如图 1 所示。

实施例 2：内含体的提取和纯化

下列步骤涉及 PLGF-1 的内含体的制备和重折叠。依靠重折叠，PLGF-1 细菌蛋白被部分恢复成二聚体形式。

材料：

适当容量的混和器

裂解溶液：1 mM Mg₂SO₄ + 20mM Tris-HCl pH8 +1%Triton X100.

洗涤溶液：0.5% triton X100 + 10 mM EDTA pH 8.

BD (变性缓冲液)：8 M 尿素，50 mM Tris pH 8，乙二胺 20mM.

溶解于水中。

氧化型谷胱甘肽 200x：100 mM，水中

还原型谷胱甘肽 200x：250 mM，水中。

稀释缓冲液：终浓度 600 μ M 的 PEG 4000 (2. 4g/l)

50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM NaCl.

防泡剂：Antifoam O-10 (非硅) Sigma

PLGF-1 内含体的制备。

在室温 (RT) 平衡裂解和洗涤溶液。

在 - 80/37℃实施冻/融循环。

以每 450 OD600 细菌 1ml 裂解溶液的浓度使细菌沉淀溶解。

接着在 RT 孵育 30 分钟，同时搅拌 (250rpm)

该溶液倒入适当容量的混和器中，每 450 OD600 细菌添加 3ml

洗涤溶液。

如果需要，每毫升样品添加 0.4 μ l 未稀释防泡剂。

该溶液以最大速度离心 1 分钟或直到样品被很好均质化。

接着混和器的内容物转移到适当容量的容器中并且每 450 OD600 细菌添加 6.5ml 洗涤溶液。在搅拌下室温培养 45 分钟。

如此获得的悬液在 25 $^{\circ}$ C 以 13.000 x g 离心 45 分钟并倒出上清。

沉淀以每 450 OD600 细菌 4ml 洗涤溶液的浓度进行重悬，并在混和器中进行第二次重复循环。

悬液转移到适当容量的容器中，每 450 OD600 细菌用 6.5ml 洗涤溶液稀释并在室温搅拌下培养 30 分钟。

接着在上述条件下重复离心并除去上清。

实施例 3: 蛋白的复性

内含体溶于 7ml 变性缓冲液 BD (含尿素 8M) 中并进一步稀释于 BD 直到 OD280 为 0.8。随后，为了使尿素终浓度达到 5M，添加 0.6 体积的稀释缓冲液。

其后添加 1/200 还原型谷胱甘肽 200 $\times$ (终浓度 1.25mM) 和 1/200 氧化型谷胱甘肽 200 $\times$ (终浓度 0.5mM)。取 15 μ l 用于检查的样品 (prerefol)，接着溶液在 20 $^{\circ}$ C 搅拌下培养 18 - 20 小时。

培养末期，培养基在 20 $^{\circ}$ C，10.000 $\times$ g 离心 10 分钟，依靠 0.45 或 0.8 μ m 过滤器过滤并取 15 μ l 样品用于检查 (postrefol)。

结果：依靠 SDS-PAGE 电泳分析 15 μ l 重折叠前和重折叠后的溶液 (图 5)。

实施例 4: 阴离子交换层析

下列步骤涉及重折叠后 PLGF-1 蛋白纯化的第一步。样品装入柱上后，将有不被吸收的 PLGF-1 单体的高度损失。装入的量应该不超过柱体积的 10 倍，因为这将引起 PLGF-1 二聚体的明显损失。

在 20% 缓冲液 B (见下) (相当于 200mM NaCl 浓度) 的等度洗脱条件下进行洗脱。洗脱峰仍含有用于重折叠的谷胱甘肽，它形成大约 50% 的 OD280。

材料和参数:

FPLC 系统: Amersham-biosciences 出售, 由 FPLC Director 软件操作。

监测参数

U. V.: 波长 = 280 nm; scale top = 2.

温度: 20°C (最小 15, 最大 25)

树脂: Q-Sepharose Fast Flow (Amersham-biosciences).

柱体积/高度: 体积: 待装入样品体积的 1/10; 高度: 13 和 16 cm 之间。

平衡: 2 柱体积(CV)的缓冲液 B, 接着 1.5 CV 的缓冲液 A.

样品: 复性、离心和/或过滤的 PLGF-1. 至多装入其 10 CV.

缓冲液 A: 20 mM 乙醇胺-HCl pH 8.5.

缓冲液 B: 缓冲液 A + 1M NaCl.

灌注速度: 1 cm/分 (在小柱上测试的最大速度 = 1.887 cm/分; 测试的最小速度 = 0.5 cm/分.).

洗脱速度: 1 cm/分 (在小柱上测试的最大速度 = 1.887 cm/分; 测试的最小速度 = 0.5 cm/分.).

灌注后洗涤: 1.5 CV 的 0% 缓冲液 B.

收集峰: 在 20% 缓冲液 B 的等度洗脱条件下运行大约 3CV 而洗脱的峰。

最后洗涤: 2 CV, 100% B.

步骤:

收集在 20% 缓冲液 B 的等度洗脱条件下洗脱的峰, 接着向其中添加 0.271 体积水, 0.0045 体积 TFA 和 0.225 体积乙醇。这样样品结果被稀释 1.5 倍, 含有 15% 乙醇和 0.3% TFA。添加这两种物质促进 PLGF-1 与反相树脂的结合 (见实施例 5)。

结果: 通过监测 280nm 的光密度连续控制层析步骤, 如图 2 所示。

依靠 SDS-PAGE 电泳分析分离的蛋白材料的纯度 (图 5)。

实施例 5: 反相层析

可以在 RP source 树脂 (15 微米或 30 微米平均颗粒直径) 实施下列步骤。然而, 尽管不会使纯化方法产生任何改变, 30 微米 RP source 树脂允许树脂本身的经济节约 (大约 50 %), 柱的装填步骤更加容易和反压更低。

该步骤涉及通过 QFF 树脂后 PLGF-1 蛋白纯化的第二阶段。样品灌注过程中, 高吸附度很明显并相当于不结合树脂的谷胱甘肽的未吸附峰。这个步骤由 2 个分阶段组成, 前者称为 RPCmon, 用于除去大部分 PLGF-1 单体成分, 而后者用于洗脱主要是二聚体成分的蛋白并且它称作 RPCdim。

第一个分阶段 (RPCmon)

材料和参数:

FPLC 系统: Amersham-biosciences 出售, 由 FPLC Director 软件操纵。

监测参数

U. V.: 波长 = 280 nm; full scale = 0.05.

温度: 20 °C (最小 15, 最大 25)

树脂: 反相 Source 30 (Amersham- biosciences).

柱体积/高度: 体积: 待装入样品整体 OD280 的 1/5 - 1/6; 高度: 27 和 33 cm 之间.

平衡: 2 柱体积(CV)的缓冲液 B, 接着 2CV 的缓冲液 A.

样品: 来自前面步骤 (实施例 4) 的 PLGF-1, 稀释 1.5 倍, 含有乙醇 15 % 和 TFA 0.3 %。每毫升树脂最大装入 4.5 至 5.5 OD280.

缓冲液 A: 乙醇 40 % + TFA 0.1 %.

缓冲液 B: 乙醇 70 % + TFA 0.1 %.

灌注速度: 1.887 cm/分.

洗脱速度: 1.887 cm/分.

灌注后洗涤: 1.5 CV 的 4 % 缓冲液 B.

单体峰: 梯度范围为 12CV (3 % B/CV) 的 4 至 40 % B。就在峰洗脱开始之后, 到 OD280 达到全刻度(full scale)的 25 % 时, 以该时刻的

缓冲液 B 浓度持续进行等度洗脱直到洗脱峰完成 (大约 2.5-3.5 CV)。

操作

取对应于“单体”峰的合适量溶液并浓缩进行检查 (图 5 中 mon)。

第二分阶段 (RPCdim)

材料和参数:

无需再次平衡该柱, 但是 UV 监测器的刻度范围移至值 2, 梯度范围从 10 - 100 % 的缓冲液 B 运行 2.2CV(40.9% B/CV)。

操作:

取对应于“二聚体”峰的馏分。图 4 显示了其实例。收集它们并测定体积和 280nm 的光密度。

通过 OD280 乘以稀释倍数乘以体积计算冷冻干燥前获得的整体产量 (以 mg 表示)。这种产量的平均值是每升细菌培养物 164mg 纯 PLGF-1, 标准差是 23.21。也以每 1000 OD600 发酵细菌的 mg 量来表示, 得到每 1000 OD600 发酵细菌 5.58mg 纯 PLGF-1 的结果, 标准差是 0.8。

如此获得的二聚体溶液保存在 -20℃ 直到超滤和冷冻干燥。这种溶液样品进行 SDS-PAGE 电泳, 如图 5 所示。

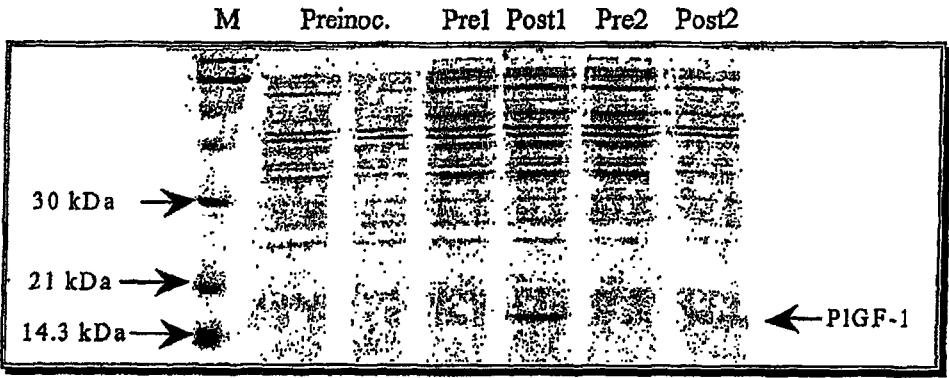


图 1

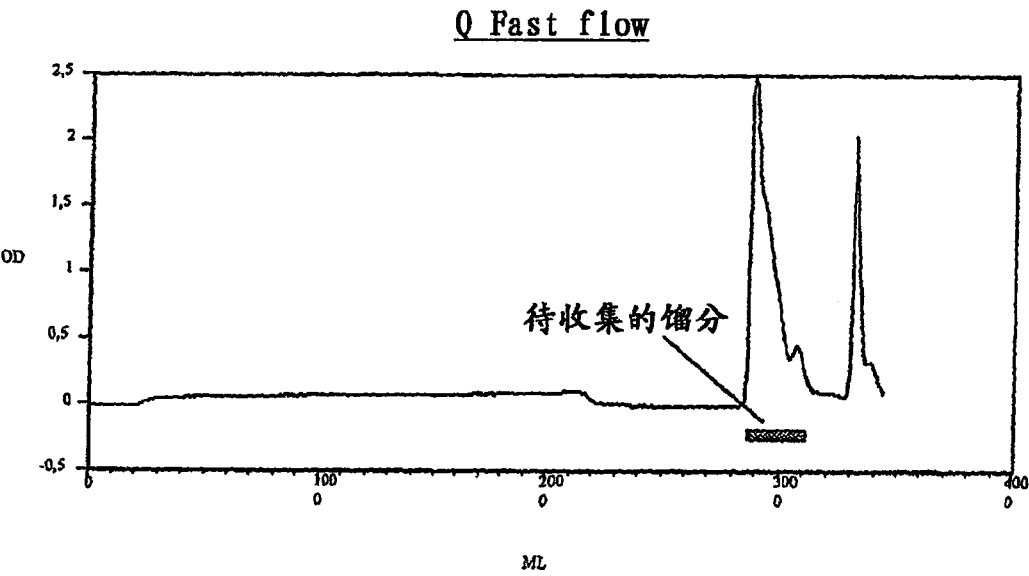


图2

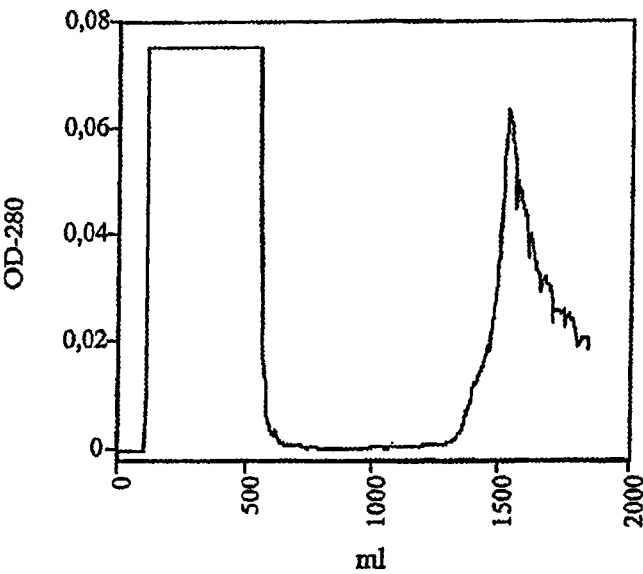


图 3

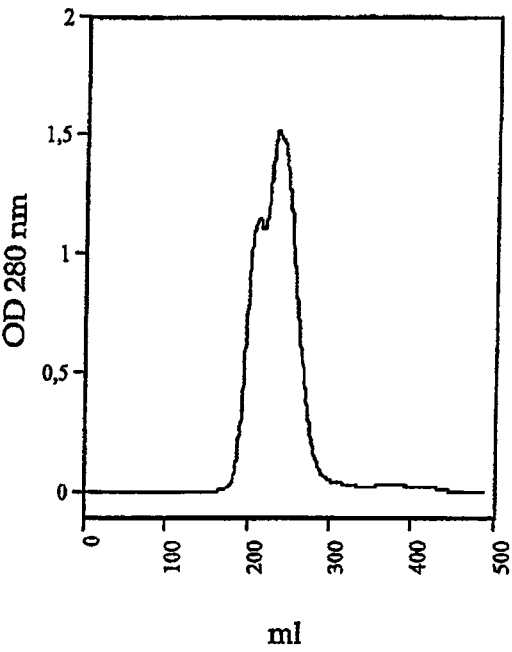


图 4

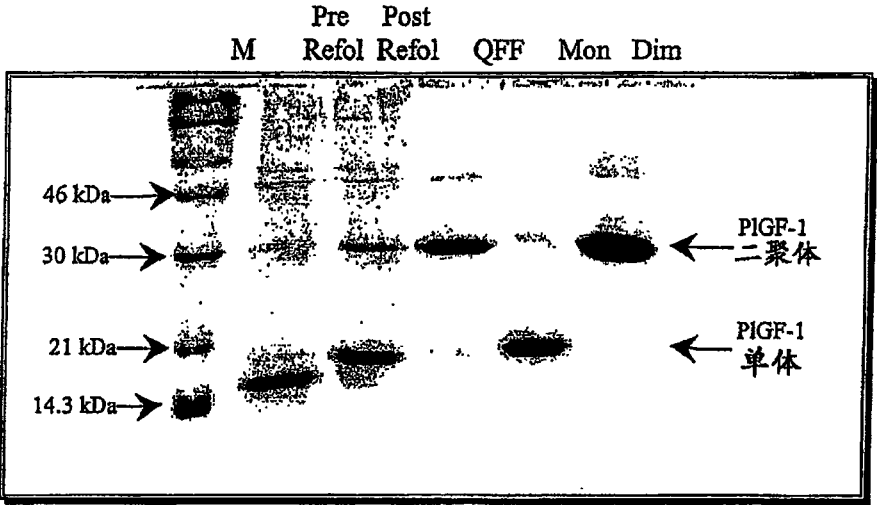


图5