

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.02.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.02.2002**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2002IT/0200065**
(33) Země priority: **WO**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2005**
(Věstník č. 2/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/IT2002/000065**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/066676**

(21) Číslo dokumentu:

2004-892

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
C 07 K 14/415

(71) Přihlašovatel:

GEYMONAT S.P.A., Anagni, IT

(72) Původce:

Maglione Domenico, Anagni, IT
Battisti Mauro, Carpineto, IT
Conti Ettore, Rocca di Papa, IT
Salvia Giuseppe, Catania, IT
Tucci Marina, Anagni, IT

(74) Zástupce:

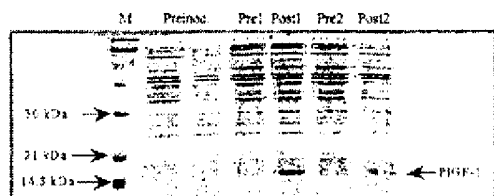
JUDr. Miloš Všecký, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy rekombinantního
placentárního růstového faktoru**

(57) Anotace:

Způsob extrahování a purifikace rekombinantního placentárního růstového faktoru (PLGF) exprimovaného v indukovatelném prokaryotickém expresním systému zahrnující následující stupně: (I) fermentace bakteriálních buněk, (II) extrakce a purifikace inkluzních tělísek, (III) renaturace exprimovaného proteinu, (IV) iontoměničová chromatografie, (V) chromatografie s reverzními fázemi.



Způsob přípravy rekombinantního placentárního růstového faktoru

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu extrahování a čištění rekombinantního placentárního růstového faktoru z geneticky modifikovaných buněk.

Dosavadní stav techniky

Placentární růstový faktor (PLGF) je homodimerní glykoprotein se strukturou podobnou vaskulárnímu endotheliálnímu růstovému faktoru (VEGF). Úplná polynukleotidová sekvence kodifikující PLGF protein byla popsána autory *Maglione a Persico* v evropském patentu č. EP-B-550 519 (mezinárodní publikovaná patentová přihláška WO-A-92/06194) s prioritou Itálie ze dne 27.9.1990. Alternativní metody spojování ARN a PLGF generují tři homologní formy tohoto placentárního růstového faktoru, konkrétně PLGF-1, PLGF-2, a PLGF-3, které mají různé polypeptidové sekvence, přičemž všechny tyto formy jsou známy a popisovány v publikacích podle dosavadního stavu techniky.

Ve výše zmiňovaném patentu je rovněž popisována metoda přípravy PLGF faktoru zahrnujícího použití indukovatelného prokaryotického expresního systému charakterizovaného hostitelskými buňkami modifikovanými expresním vektorem, ve kterém je lidský PLGF gen integrován pod kontrolou indukovatelného promotoru (přímo nebo nepřímo). Po indukci PLGF exprese vhodným aktivátorem se buňky inkubují, izolují a podrobí se lýze.

Tento tak zvaný surový lyzát představuje komplexní směs proteinů obsahující nízký podíl exprimovaného PLGF proteinu a

mající malou specifickou aktivitu. Ve skutečnosti při známých procesech se proteinová exprese vyvolá v kulturách majících malou buněčnou hustotu, což je evidentní z nízké optické hustoty v době indukce, která se pohybuje v rozmezí od 0,2 až 0,6 OD při 600 nm. Kromě toho je ve výše uváděném dokumentu popisován postup, který nezahrnuje další purifikační stupně tohoto exprimovaného proteinu. Z tohoto důvodu jsou lyzáty získané postupem podle publikované mezinárodní patentové přihlášky WO-A-92/06194 jako takové nevhodné pro přímé použití při přípravě léčiv.

Komplexnější metoda purifikace tohoto placentárního růstového faktoru je navrhována autory *Maglione a kol.* v publikaci „*Il Farmaco*“, 55 (2000), str. 165 až 167. Ovšem metoda zde uvedená pouze poskytuje jednoduchý přehled známých aplikovatelných technik, aniž by zde byl uveden popis podmínek a experimentální detaily těchto metod, které jsou podstatně důležité pro získání PLGF proteinu v čistotě a množství nezbytném pro farmaceutické použití.

Cílem předmětného vynálezu je navrhnout novou metodu extrahování a čištění rekombinantního PLGF exprimovaného v bakteriálních buňkách a umožňující získat PLGF ve vysoké čistotě a s takovým výtěžkem, který by umožňoval vhodné využití tohoto postupu v průmyslovém měřítku pro výrobu léčiv.

Dalším cílem předmětného vynálezu je získat PLGF protein ve v podstatě aktivní formě (větší než 98,5 %), který by byl hlavně tvořen dimerní formou (minimálně 70%) a multimerními formami, přičemž by obsahoval zbytky monomerní formy (málo aktivní nebo neaktivní) v množství maximálně 1,5%.

Podstata vynálezu

Předmětný vynález je založen na identifikaci pořadí purifikačních technik zejména vhodných pro provedení extrakce a purifikace lidského /LGF exprimovaného v bakteriálních buňkách. Předmětný vynález je dále založen na určení optimálních operačních podmínek pokud se týče jednotlivých technik a chemicko-fyzikálních znaků látky, která je určena k čištění.

Podstatou předmětného vynálezu je tedy postup extrahování a purifikace rekombinantního placentárního růstového faktoru (PLGF) exprimovaného za pomoci indukovatelného prokaryotického expresního systému zahrnující stupně:

- (I) fermentace bakteriálních buněk,
- (II) extrakce a purifikace inkluzních tělísek,
- (III) renaturace exprimovaného proteinu,
- (IV) iontoměničová chromatografie,
- (V) chromatografie s reverzními fázemi, a
- (VI) případně závěrečné stupně ultrafiltrace, formulace a lyofilizace.

Při provádění této metody se fermentace (stupeň I) provádí až do získání vysoké bakteriální hustoty v médiu, což je patrné z vysoké optické hustoty média, načež následuje stupeň indukování. Stupeň (II) zahrnuje bakteriální lýzu, narušení DNA a izolování inkluzních tělísek. Renaturace exprimovaného proteinu (stupeň III) se dosáhne solubilizací těchto inkluzních tělísek v denaturačním pufru a transformováním, přinejmenším částečným, exprimovaného proteinu v dimerní formě. Nakonec se ve stupních (IV) a (V) dimerní a multimerní formy tohoto exprimovaného proteinu oddělí od monomerní formy a izolují se v čisté formě, přičemž potom následuje jejich ultrafiltrace a lyofilizace v přítomnosti obvykle používaných lyofilizačních a formulačních aditiv.

Specifickým cílem předmětného vynálezu je výše zmiňovaný postup extrakce a purifikace PLGF-1 proteinu lidského původu, ovšem v podstatě určený rovněž pro PLGF-1 zvířecího původu.

Tento postup podle předmětného vynálezu výhodně umožňuje dosažení výtěžků exprimovaného proteinu třicetkrát až padesátkrát vyššího než jsou výtěžky dosažené metodou popsanou v předchozí části dosavadního stavu techniky. Tento postup podle předmětného vynálezu dále umožňuje získání vysoce čistého proteinu s vysokou specifickou aktivitou a v podstatě v dimerní formě.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je aktivní placentární růstový faktor získatelný pomocí prostředků podle předmětného vynálezu, prostý veškerého zbytkového proteinu nebo jiných bakteriálních znečišťujících látek a obsahující zbytky monomerní formy v maximálním podílu 1,5%.

Popis příložených obrázků

Obr. 1 : Na tomto obrázku jsou zobrazeny výsledky získané elektroforézou SDS-PAGE za redukčních podmínek pro monitorování stupně I. Pre1 a Pre2 představují pre-indukční kontroly, připravené následujícím způsobem. Krátce před indukcí byl odebrán podíl při asi 0,064 jednotkách optické absorpce, měřeno při 600 nm (OD 600), zředěn pětinasobným podílem vody. Z takto zředěného podílu bylo odebráno 20 µl redukčního pufru a tento podíl byl podroben varu. Potom bylo 20 µl tohoto posledního roztoku vloženo na SDS PAGE matrici. Post1 a Post2 reprezentují post-indukční kontroly připravené stejným výše uvedeným způsobem. M znamená směs markerů o dané molekulové hmotnosti. V post-indukčních sloupcích (Post1 a Post2) je možno zaznamenat pás těsně nad indikací molekulové hmotnosti 14,3, který se v podstatě nevyskytuje v pre-

indukčních sloupcích (Pre1 a Pre2), což odpovídá PLGF-1 proteinu exprimovanému a oddělenému v inkluzních těliscích.

Obr. 2 : Tento obrázek znázorňuje monitorovací chromatogram anexového chromatografického postupu (výměna aniontů) prováděného na pryskyřici Q-Sepharose Fast Flow. Na ose x jsou zaznamenány eluční objemy (ML) a na ose y jsou zaznamenány jednotky optické absorpce (OD). První eluční pík získaný při 20 % eluci pufrém B (chlorid sodný NaCl, 200 mM) odpovídá PLGF-1 proteinu ve v podstatě dimerní formě, ovšem tento produkt obsahuje znečišťující látky a monomerní formu. Následující pík, získaný při 100 % eluci pufrém B (chlorid sodný NaCl, 1M) obsahuje nečistoty, které jsou eliminovány.

Obr. 3 : Na tomto obrázku je znázorněn monitorovací chromatogram prvního elučního stupně při provádění chromatografie s reverzní fází na pryskyřici RP Source 30. Na ose x jsou zaznamenány eluční objemy (ml), na ose y jsou zaznamenány jednotky optické absorpce (OD). První významný eluční pík odpovídá různým znečišťujícím látkám, které se neváží na pryskyřici. Druhý eluční pík odpovídá PLGF proteinu v monomerní formě eluovanému za isochratických podmínek (experimentálně zjištěno při asi 10% až 15% pufru B).

Obr. 4 : Tento obrázek znázorňuje monitorovací chromatogram druhého elučního stupně při provádění chromatografie s reverzní fází na pryskyřici RP Source 30. Na ose x jsou zaznamenány eluční objemy (ml), na ose y jsou zaznamenány jednotky optické absorpce (OD). Eluční pík odpovídá PLGF proteinu v dimerní-multimerní formě.

Obr. 5 : Na tomto obrázku jsou znázorněny výsledky získané při elektroforéze za pomoci SDS-PAGE pro finální monitorování celého procesu. Prerefol a Postrefol představují kontroly předcházející a následující po renaturaci exprimovaného

proteinu (stupeň III). QFF představuje pík při eluci na pryskyřici Q-Sepharose s rychlým průtokem, kde je obsažen protein hlavně v dimerní formě. Mon znamená pík obsahující monomerní formu. Dim znamená pík získaný při eluci ve druhém podstupni chromatografického postupu s reverzní fází na pryskyřici RP Source 30. V této souvislosti je třeba poznamenat, že před renaturací je exprimovaný protein hlavně v monomerní formě. Po renaturaci je část proteinu v dimerní formě. Následující purifikace za použití chromatografie QFF a RF 30 umožňuje získání PLGF-1 proteinu s vysokým stupněm čistoty.

Genetická modifikace bakteriálních hostitelských buněk je popsána autory Maglione a kol. ve výše citovaném patentu EP-B-0550519 (mezinárodní publikovaná patentová přihláška WO-A-92/06194). Z tohoto důvodu byly bakteriální buňky transformovány zavedením expresního vektoru obsahujícího insert odpovídající lidskému genu, který kóduje PLGF-1 faktor. Úplná genová sekvence je z literatury známa, přičemž je volně dostupná. Plasmid obsahující tuto sekvenci byl uložen ve sbírce ATCC pod označením ATCC č. 40892. Tato exprese se provede pod kontrolou systému RNA polymerázy T7 fágu, přičemž je indukována IPTG (isopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid).

Nicméně je možno použít i jiné indukovatelné prokaryotické expresní systémy. Jako příklady těchto systémů, běžně dostupných na trhu, je možno uvést následující:

(1) *pBAD expresní systém (In vitrogen BV)*, kde syntéza proteinu je umístěna pod kontrolou araBAD promotoru, přičemž může být indukována na různých kmenech *E. coli* za pomoci arabinózy.

(2) *T7 expresní systém (In vitrogen BV nebo Promega)*, kde syntéza proteinu je kontrolována promotorem RNA polymerázy T7

fágu, přičemž může být indukována za pomoci laktózy nebo jejích analogů (IPTG). V tomto případě je vyžadováno použití derivátů *E. Coli* typu DE3 (B121(DE3) nebo JM109(DE3)) obsahující zejména kopii genu Rna polymerázy T7 fágu umístěného pod kontrolou promotoru indukovatelného laktózou.

(3) *Trc expresní systém (In vitro BV)*, kde syntéza proteinu je umístěna pod kontrolou trc hybridního promotoru. Tento promotor byl získán spojením trp promotoru a lac promotoru, přičemž může být indukován v různých kmenech *E. Coli* za pomoci laktózy nebo jejích analogů (IPTG).

(4) *Tac expresní systém (Amersham biosciences)*, kde syntéza proteinu je umístěna pod kontrolou tac promotoru. V tomto systému se syntéza proteinu indukuje v kmenech *E. Coli* lacIq (typ JM105) za pomoci laktózy nebo jejích analogů (IPTG).

(5) *P_L expresní systém*, kde syntéza proteinu je umístěna pod kontrolou PL promotoru, přičemž může být indukována přidáním tryptofanu. V tomto případě je vyžadováno použití derivátů *E. coli* (GI724) obsahujících kopii genu kodifikujícího cI represor fágu Lambda umístěného pod kontrolou promotoru indukovatelného tryptofanem.

Stupeň (I) : Fermentace a indukce.

První stupeň postupu podle předmětného vynálezu představuje fermentace funkčně-modifikovaného bakteriálního kmene ekvivalentního kmeni popisovanému ve výše citovaném evropském patentu (viz výše). Ve výhodném provedení je tento mikroorganismus derivát *Escherichia Coli* modifikovaný expresním plasmidem obsahujícím lidský gen PLGF. Výhodným mikroorganizmem je mikroorganismus označovaný [B12(DE3)pLysS PLGF-1] získaný integrováním genu lidského PLGF-1 do běžné

dostupného kmenu [B12(DE3)pLysS] (Promega Corporation USA). Předmětný vynález ovšem není omezen na lidský PLGF-1 faktor, ale týká se rovněž PLGF-1 zvířecího původu (opice, myš, králík, atd.). Předmětný vynález není rovněž omezen pouze na použití derivátu E. coli, ale rovněž zahrnuje použití vhodného prokaryotického mikroorganismu umožňujícího genetickou modifikaci a schopného exprimovat heterologní proteiny v podobě inkluzních tělísek.

Kmeny použité jako inokulum při provádění postupu podle předmětného vynálezu jsou udržovány před jejich použitím v lyofilizované formě za účelem zachování jejich expresní kapacity. Při použití je tento lyofilizovaný materiál znovu uveden do formy roztoku za použití vhodného pufru.

I kdy je na trhu k dispozici velké množství běžně známých kultivačních médií, které je možno použít v postupu podle předmětného vynálezu, provádí se fermentace ve výhodném provedení podle vynálezu v médiu zbaveném veškerého materiálu zvířecího nebo lidského původu, aby se předešlo riziku infekce. Nejvhodnější prostředky k provádění postupu podle předmětného vynálezu představují kvasnicové extrakty (Difco) přidané společně s jedním nebo více vhodnými antibiotiky. Ve výhodném provedení se použije médium, které bylo získáno smícháním prvního roztoku (A) obsahujícího kvasnicové extrakty, glycerol a síran amonný s druhým roztokem (B) obsahujícím fosfátový pufr, za sterilních podmínek. Takto získaná směs se potom spojí s ampicilinem a chloramfenicolem nebo s jinými ekvivalentními antibiotiky. Vhodná koncentrace těchto antibiotik se pohybuje v rozmezí od 50 µg/ml do 300 µg/ml ampicilinu, ve výhodném provedení 100 µg/ml do 200 µg/ml ampicilinu, a 10 µg/ml až 100 µg/ml chloramfenicolu, ve výhodném provedení 30 µg/ml až 40 µg/ml chloramfenicolu.

Před fermentačním stupněm je možno uskutečnit pre-inokulační stupeň, při kterém se mikroorganismus suspenduje v médiu a podrobí se postupně stupňům inkubování a ředění zaměřeným na to, aby bylo dosaženo v této kultuře optimálního množství buněk mikroorganismu. Ve výhodném provedení podle vynálezu se tento mikroorganismus inkubuje po dobu přes noc při teplotě 37 °C, načež se zředí a inkubuje se znovu po dobu několika hodin. Vybraný objem pre-inokula se potom odstředí, znovu se suspenduje v kultivačním roztoku obohaceném ampicilinem a inokuluje se ve fermentační nádobě k provedení fermentačního stupně.

Tato fermentace se provede ve výše uvedeném médiu, do kterého se přidá ampicilin a chloramfenicol, při teplotě vhodné pro daný mikroorganismus, obvykle při teplotě asi 37 °C, v přítomnosti procentuálního podílu rozpuštěného kyslíku pohybujícího se v rozmezí od 20% do 40%, ve výhodném provedení odpovídajícímu 30%, vztaženo na nasycení vzduchem. Hodnota pH se během fermentování udržuje na hodnotě neutrální nebo na slabě kyselé hodnotě (v rozsahu 6,4 až 7,4). Kromě toho, vzhledem k tomu, že se fermentační postup provádí za míchání, používají se ve výhodném provedení protipěnicí činidla.

Provádění fermentačního postupu je doprovázeno zvyšováním optické hustoty média. Z tohoto důvodu je tento parametr optické hustoty používán podle předmětného vynálezu k monitorování stupně rozsahu fermentace. Zejména jsou vhodné údaje získané při 600 nm.

Podstatným znakem předmětného vynálezu je dosažení vysoké buněčné hustoty v kultuře ve fázi indukce exprese. Díky kultivačnímu médiu podle předmětného vynálezu je možno dosáhnout hodnot optické hustoty při 600 nm (OD600)

pohybujících se v rozmezí od 1 do 50. Výhodné jsou ovšem hodnoty hustot, které jsou vyšší než 18, přičemž při těchto hodnotách se dosáhne vysoké úrovně produktivity, typické pro postup podle předmětného vynálezu. K indukování produkčního bakteriálního kmene a dosažení optimálních výsledků jsou zejména výhodné hodnoty hustoty v rozmezí od 16 do 20. Průběh fermentace se potom udržuje za výše uvedených podmínek až do dosažení uvedených hodnot optické hustoty, načež se indukuje exprese proteinu.

Výhodně je možno využít kterékoli libovolné činidlo nebo chemicko-fyzikální podmínky schopné indukovat v buňkách použitého mikroorganismu mechanismus exprimování heterologního proteinu. V jednom ze specifických případů, kdy se použije bakteriální kmen BL21 (DE3)pLysS modifikovaný expresním plasmidem obsahujícím promotor T7 fágu, se exprimování indukuje laktózou nebo jejími deriváty, jako je například isopropyl- β -tiogalaktopyranosid (IPTG), o vhodné koncentraci, zejména o koncentraci asi 1 mM. Doba trvání indukce se může volit podle okamžité potřeby. Dobrých výsledků se dosáhne v případě zvolení intervalu několik hodin, výhodně v rozmezí od 3 do 4 hodin; při provádění optimálního procesu se doba indukce provádí po dobu 3 hodin a 20 minut, přičemž procentuální podíl rozpuštěného kyslíku odpovídá asi 10%.

Před provedením indukce a po indukci se odeberou vzorky buněk, které se podrobí analytické kontrole, jako je například elektroforéza za použití SDS-PAGE, za účelem stanovení výsledku indukce.

Ve fázi, kdy exprimování proteinu dosáhne požadované úrovně, se kultivační prostředí odstředí a buňky se převedou do následujícího stupně.

Stupeň II : Extrakce a purifikace.

Exprimovaný heterologní protein v bakteriálních kmenech se oddělí uvnitř buněk samotných ve formě inkluzních tělísek. Z tohoto důvodu postup podle předmětného vynálezu zahrnuje pasážování a lýzu buněk, narušení extrahovaného nukleového materiálu (DNA) a regenerace a promývání inkluzních tělísek.

Tyto buňky se promyjí, i když to není nezbytné, a potom se suspendují v roztocích obsahujících emulgační činidla ve vhodné koncentraci, ve výhodném provedení se použije Triton X100 v koncentraci pohybující se v rozmezí od 0,5% do 1%, načež se podrobí lýze buněčné membrány. Tento proces lýzy se provádí za provádí za použití zmrazení/roztavení, metodou „French Press“ (francouzský lis), sonikací (zpracování ultrazvukem) nebo jinými podobnými běžně známými metodami. Nicméně výhodnou metodou v případě bakteriálního kmene BL21 (DE3)pLyss je metoda zahrnující zmrazení/roztavení, která se podle nejvýhodnějšího provedení podle vynálezu opakuje přinejmenším ve dvou následně prováděných cyklech. Po provedení mechanické lýzy tento stupeň lýzy pokračuje po dobu několika minut v lýzovém roztoku při teplotě místnosti a za míchání.

Uvolnění inkluzních tělísek v lýzovém médiu je doprovázeno uvolněním komponent odlišných od mikroorganismu a buněčných látek, především nukleových materiálů. Tyto látky mohou nepříznivě ovlivňovat a ohrozit následně prováděný proces purifikace proteinu. Z tohoto důvodu se suspenze/roztok získaný lýzou podrobí narušení tohoto nukleového materiálu, konkrétně DNA, za pomoci enzymatických činidel, jako je například DNAza (přírodní nebo rekombinantní, jako je například benzonáza), chemických činidel, jako je například deoxycholová kyselina, nebo fyzikálně-mechanických prostředků,

jako je například sonikace (zpracování ultrazvukem) nebo vysokoenergetickým mícháním pomocí lopatek, například v míchacím zařízení. Narušení DANN, provedené například v míchacím zařízení, se provede s lyzovanými buňkami resuspendovanými ve vhodném objemu promývacího roztoku obsahujícího chelatační a detergentová činidla, jako je například EDTA a Triton X100. Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu se tento postup opakuje ve více cyklech, ve výhodném provedení ve dvou cyklech, střídavě s prováděním stupňů zředění v promývacím roztoku, odstřeďování a eliminování supernatantu (kapaliny nad usazeninou) za účelem odstranění složek a buněčných látek z frakce obsahující inkluzní tělíska.

Stupeň III : Renaturace (refolding neboli znovusestavení struktury) proteinu.

Frakce obsahující purifikovaná inkluzní tělíska PLGF-1 se potom solubilizují v denaturačním pufru, který obsahuje běžně známá denaturační činidla, jako je například močovina, guanidinisothiokyanát, guanidinhydrochlorid. Ve výhodném provedení se jako denaturační roztok použije roztok močoviny v denaturační koncentraci například 8 M. Za účelem urychlení procesu solubilizace může být tato frakce podrobena ve výhodném provedení homogenizaci nebo sonikaci. Po solubilizaci inkluzních tělísek se roztok zředí stejným denaturačním pufrům takovým způsobem, aby se dosáhlo optické hustoty měření při 280 nm asi 0,8 (OD₂₈₀ 0,8). V následné fázi se tento roztok dále zředí ředícím pufrům tak, aby bylo dosaženo hodnoty 0,5 OD₂₈₀. Vhodné ředící roztoky obsahují soli polyethylenglykolu (PEG), přičemž mají bazickou hodnotu pH (asi 8). Renaturace PLGF-1 proteinu ve zředěném roztoku se dosáhne přidáním do tohoto roztoku vhodné koncentrace oxidačních/redukčních párů, načež potom následuje inkubování po dobu 10 až 30 hodin, ve

výhodném provedení po dobu 18 až 20 hodin, při teplotě v rozmezí od 10 °C do 30 °C, ve výhodném provedení při teplotě 20 °C, a za míchání. Jako příklad těchto párů je možno uvést: cystin/cystein, cystamin/cysteamin, 2-hydroxyethylidisulfid/2-merkapt ethanol. Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu se jako oxidační/redukční pár použije glutathion ve své oxidované a redukované formě o koncentraci v rozmezí od 0,1 mM do 2,5 mM (ve výhodném provedení o koncentraci 1,25 mM). Pomocí renaturace se PLGF-1 protein exprimovaný v podstatě v monomerní formě částečně převede zpět na dimerní formu (viz obrázek č. 5).

Stupeň IV : anexová chromatografie (výměna aniontů)

Roztok přicházející z předchozího stupně, ve výhodném provedení přes fázi odstředování a/nebo filtraci, obsahuje protein, který je hlavně v monomerní formě a částečně dimerní formě, přičemž tento roztok je přiveden na anexovou pryskyřici (měnič aniontů) za účelem obohacení směsi dimerní formou a její vyčištění od bakteriálních znečišťujících látek. V tomto případě je možno použít jakoukoliv libovolnou běžně dostupnou matici vhodnou k provedení anexové chromatografie, pokud ovšem její charakteristiky týkající se kapacity, náplně a rychlosti průtoku budou podobné jako u pryskyřice Q Sepharose s rychlým průtokem (Q Sepharose Fast Flow), Amersham Biosciences), kromě toho, že je vhodná k provádění procesů v průmyslovém měřítku. Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu se použije pryskyřice s vysokým průtokem, například Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) nebo ekvivalentní produkt. Tyto pryskyřice se promyje a ekvilibruje roztoky, které mají malou iontovou sílu. Jako příklad tohoto roztoku je možno uvést roztok obsahující ethanolamin-HCl o pH 8,5 s malým obsahem soli nebo bez soli. Stejný roztok je možno použít pro plnění, absorbování a promytí proteinové směsi, která se má

čistit. Tyto použité pryskyřice umožňují plnění s velkými objemy proteinového roztoku s poměrem objem plnění/objem kolony pohybujícím se v rozmezí od 1 : 1 do 10 : 1. Poměry obj./obj. blíží se hodnotě 10 : 1 jsou výhodné z toho důvodu, že umožňují optimální využití kolony. Ovšem poměrům vyšším než je 10 : 1 je potřeba se vyhnout, neboť vzhledem k nasycení absorpční kapacity matrice dochází při těchto poměrech k vysokým ztrátám dimerní formy proteinu.

Zatímco PLGF-1 protein v monomerní formě jít perkuluje ve stupních promývání za použití nízké iontové síly, eluování dimerní a multimerní formy se dosáhne zvýšením iontové síly výchozího roztoku. Toto zvýšení iontové síly se dosáhne smícháním ekvilibračního roztoku s předem stanoveným procentuálním podílem druhého roztoku obsahujícího chlorid sodný NaCl o koncentraci 1 M. Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu se protein v dimerní formě eluuje roztoky obsahujícími 1 M roztok chloridu sodného NaCl o koncentraci v rozmezí od 15 % do 25 %, což odpovídá koncentraci NaCl v rozmezí od 150 do 250 mM. Podle nejvýhodnějšího provedení se protein eluuje za isochratických podmínek při koncentraci chloridu sodného NaCl 200 mM. Eluování různých látek se automaticky monitoruje měřením optické absorpce při 280 nm (viz obr. 2). Odebrané frakce obsahující PLGF-1 protein v dimerní formě se v následné fázi kontrolují SDS-PAGE elektroforézou (viz obr. 5). Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu se celý chromatografický postup automaticky provádí za použití počítačového systému a vhodného kontrolního programu, například na použití Software FPCL Director Systém (Amersham Biosciences).

Stupeň (V) : Chromatografie s reverzní fází.

Frakce přicházející z předchozího stupně a obsahující PLGF-1 protein obohacený aktivními formami se shromáždí, zředí se vhodným pufrům a plní se na chromatografickou kolonu s reverzní fází za účelem dalšího vyčištění (purifikace) proteinu v aktivní formě. Množství plněného roztoku odpovídá OD₂₈₀ v rozmezí od 4,5 do 5,5 na mililitr matrice chromatografické kolony. Tato množství je třeba považovat za maximální množství.

V této souvislosti je možno použít jakoukoliv libovolnou běžně komerčně dostupnou chromatografickou matici vhodnou pro uvažované použití do té míry, že její parametry týkající se plnění kapacity a rychlosti průtoku jsou kompatibilní s požadavky postupu podle předmětného vynálezu. Ve výhodném provedení podle vynálezu má použitá pryskyřice tělíska o takové velikosti, která zaručuje nejlepší využití absorpční schopnosti a současně umožňuje co možná nejsnadnější plnění kolony jako takové. Jako příklad těchto matic je možno uvést pryskyřice RP Source 15 nebo RP Source 30 (Amersham Biosciences). Všechny roztoky použité pro ekvilibraci, plnění, promývání pryskyřice a eluování jsou hydro-organické roztoky obsahující různé procentuální podíly organického rozpouštědla. Jako příklad těchto roztoků je možno uvést roztoky obsahující ethanol, methanol nebo acetonitril. Ve výhodném provedení podle vynálezu se používají hydro-alkoholické roztoky obsahující zvyšující se procentuální podíl ethanolu. Podle jednoho z provedení podle předmětného vynálezu se smísí vhodné podíly dvou roztoků pufrů, přičemž první obsahuje pufr A, jako je například 40 % ethanolu a 0,1 % TFA (trifluoroctová kyselina), a druhý obsahuje pufr B, jako je například 70 % ethanolu a 0,1 % TFA.

Proteinový materiál plněný na pryskyřici a vhodným způsobem promytý se potom eluuje za pomoci elučního procesu zahrnujícího dva postupně prováděné stupně, přičemž se použijí eluční roztoky obsahující zvyšující se gradient organického rozpouštědla. První stupeň se provádí za podmínek zvyšujícího se gradientu organického rozpouštědla až do dosažení elučního píku vztahujícího se na monomerní formu. Tento gradient se získá přidáváním pufru B do pufru A v procentuálním podílu v rozsahu od 4 % do 40 % se zvyšujícím se podílem pufru B o 3 % pro každý eluovaný objem z kolony. Poté, co se dosáhne tohoto elučního píku odpovídajícího monomerní formě proteinu se v eluování pokračuje za isochratických podmínek až do vyčerpání elučního píku pro monomerní formu. Takto nastavené isochratické podmínky umožňují největší možné oddělení chromatografických píků odpovídajících uvedeným dvěma formám, monomerní formě a dimerní formě, a dále nejlepší dosažitelné rozlišení těchto forem v procesu prováděném v průmyslovém měřítku a nikoliv analytického typu. Druhý stupeň se provede znovu za podmínek zvyšujícího se gradientu organického rozpouštědla, dokud se nedosáhne celé eluce proteinu hlavně v dimerní formě. V tomto druhém stupni, se gradient získá přidáváním pufru B do pufru A v procentuálním podílu pohybujícím se v rozmezí od 10 % do 100 % se zvyšujícím se podílem pufru B o 40,9 % pro každý eluovaný objem z kolony. Eluování různých forem PLGD-1 proteinu se automaticky monitoruje měřením optické absorpce při 280 nm (viz obr. 3 a obr. 4). Odebrané frakce obsahující PLGF-1 protein v podstatě v dimerní formě se v následné fázi kontrolují SDS-PAGE elektroforézou (viz obr. 5). Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu se celý chromatografický postup s reverzní fází automaticky provádí za použití počítačového systému a vhodného kontrolního programu,

například na použití Software FPCL Director Systém (Amersham Biosciences).

Výsledky elektroforézy ukazují, že PLGF-1 protein získaný ze druhého stupně chromatografie s reverzní fází je ve vysoce čisté aktivní formě, konkrétně obsahuje protein v dimerní formě a částečně v multimerní formě, ovšem je v podstatě prostý veškeré kontaminace monomerní formou. Takto získaný produkt obsahuje minimálně 98,5 % aktivní formy, ve výhodném provedení minimálně 99,5 % aktivní formy, přičemž minimálně 70 % je v dimerní formě. Zbytek monomerní formy je přítomen maximálně v podílu 1,5 %. Protein v aktivní formě se získá průměrně v množství 160 miligramů na litr bakteriální kultury. Čistý protein získaný tímto výše popsaným způsobem podle předmětného vynálezu je možno podrobit dalším zpracovávacím stupňům, jako je například ultrafiltrace na membráně. V tomto případě se produkt zfiltruje na membráně s frakcí o limitu nižším než 30 kD nebo rovným této hodnotě a dále se podrobí diafiltraci za použití vody okyselené TFA do dosažení faktoru zředění 1 : 106. Takto získaný finální produkt je možno vhodným způsobem formulovat s lyofilizačními aditivami a provést lyofilizaci za účelem zachování nejlepší biologické aktivity.

Příklady provedení vynálezu

Předmětný vynález bude v dalším popsán a blíže vysvětlen s pomocí konkrétních příkladů provedení, které jsou ovšem pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah tohoto vynálezu.

Příklad 1

Fermentace

Následující postup se týká způsobu provedení fermentace a indukce geneticky modifikovaného mikroorganismu (MOGM)

[B121(DE3)pLysS PlGF-1] ve fermentační nádobě za použití 1 mM IPTG.

Použité materiály:

Roztok SBM obsahující:

Roztok A (na jeden litr)

kvasnicový extrakt Bacto (Difco)	34 g
síran amonný	2,5 g
glycerol	100 ml
voda	doplněk do 900 ml

Roztok B (10 X) (na 100 ml)

KH_2PO_4	1,7 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 - 3 \text{ H}_2\text{O}$	20 g, nebo
K_2HPO_4	15,26 g
voda	doplněk do 100 ml

Roztoky A a B byly odděleně autoklávovány a smíchány za použití sterilních podmínek. V alternativním provedení byly roztoky A a B smíchány a zfiltrvány za sterilních podmínek.

IPTG o koncentraci 200 mM (200 X) byl získán rozpuštěním 5 gramů čisté látky ve 100 mililitrech destilované vody. Tento roztok byl zfiltrván za použití filtrů 0,22 μm , potom rozdělen na alikvótní podíly a zmrazen při teplotě -20°C .

Použitým protipěnicím činidlem byl produkt Antifoam 0-10 (nikoliv silikonového typu) firmy Sigma Cat A-8207).

Použitým bakteriálním kmenem byl [B121pLysS PlGF-1 WCB] (Working Cell Bank).

Preinokulum: odebrána byla tuba lyofilizovaného geneticky modifikovaného mikroorganismu (MOGM) WCB a tento produkt byl suspendován v 1 mililitru SBM + 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu + 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolu.

Takto získaná suspenze byla zředěna ve 30 mililitrech SBM + 100 µg/ml ampicilinu + 34 µg/ml chloramfenikolu.

Tato suspenze byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu přes noc (O/N). Další den bylo 30 mililitrů této O/N kultury zředěno za pomoci 800 mililitrů SBM + 100 µg/ml ampicilinu + 34 µg/ml chloramfenikolu a potom byl tento podíl rozdělen do 4 jednolitrových Erlenmeyerových nádob, každá obsahovala 200 mililitrů.

Obsah každé nádoby byl potom inkubován při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Obsah těchto 4 nádob byl potom smíchán a OD600 byl dosažen zředěním v poměru 1/20 ve vodě (50 µl + 950 µl vody).

Takto získaný objem preinokula byl potom odstřeďován po dobu 10 minut při 7500 x g při teplotě 4 °C ve sterilních trubicích.

Bakterie byly potom resuspendovány ve 20 mililitrech SBM + 200 µg/ml ampicilinu + 10 µg/ml chloramfenikolu na litr fermentačního prostředí za současného míchání při 420 otáčkách za minutu a při teplotě místnosti po dobu 20 minut. Současně byla připravena fermentační nádoba a zkalibrovány kyslíkové sondy.

Tyto kyslíkové sondy byly zkalibrovány při teplotě 37 °C při 0 % dusíkem a potom při 100 % za pomoci vzduchu bez použití protipěnicích přísad a za míchání při 600 otáčkách za minutu.

Fermentace byla prováděna při následujících experimentálních podmínkách:

Médium : SBM + 200 µg/ml ampicilinu a 10 µg/ml chloramfenikolu;

Teplota : 37 °C;

% rozpuštěného kyslíku : 30 % (vztaženo na nasycení vzduchem);

pH : v rozsahu od 6,4 do 7,4.

Protipěnicí přísada: zředěna v poměru 1 : 10 ve vodě;

intenzivní míchání před jejím přidáním v množství 140 μ l na 750 mililitrů média.

Indukce:

Indukce byla provedena za následujících experimentálních podmínek:

OD600 indukce : 16 až 20;

indukční činidlo : IPTG 1 mM (finální);

% rozpuštěného kyslíku : 10% (vztaženo na nasycení vzduchem);

Doba indukce : 3 hodiny a 20 minut.

Těsně před provedením indukce bylo odebráno 20 μ l bakterií, tento podíl byl přidán do 80 μ l vody a produkt byl uchováván jako pre-indukční kontrola.

Ve fázi provedení indukce bylo provedeno přidání IPTG, přičemž konečná koncentrace odpovídala 1 mM.

Procentuální podíl rozpuštěného kyslíku byl upraven na 10 %.

Na konci indukce byla zjištěna konečná hodnota OD600 a změřen byl celkový objem.

Potom bylo odebráno 10 μ l bakterií, tento podíl byl přidán do 90 μ l vody a produkt byl uchováván jako post-indukční kontrola.

Indukce byla kontrolována za použití SDS-PAGE elektroforézy naplněním 20 μ l předchozích dvou vzorků zpracovaných varem.

Médium obsahující indukované bakterie bylo potom odstředováno při 7500 x g po dobu 10 minut a při 3000 x g po dobu 25 minut při teplotě 4 °C, načež byl odstraněn supernatant.

Výsledky:

Výsledky indukce byly zjišťovány SDS-PAGE elektroforézou, přičemž tyto výsledky jsou uvedeny na obr. 1.

Příklad 2

Extrakce a purifikace inkluzních tělísek.

Následující postup se týká přípravy a znovusestavení struktury (refolding) inkluzních tělísek PLGF-1. Pomocí tohoto znovusestavení struktury (refolding) se PLGF-1 bakteriální protein částečně přivede zpět na dimerní formu.

Materiál:

Mixér o vhodné kapacitě.

Roztok pro lýzu : 1 mM Mg₂SO₄ + 20 mM Tris-HCl o pH 8 + Triton X100, 1%.

Promývací roztok : 0,5 % triton X100 + 10 mM EDTA o pH 8.

BD (denaturační pufr) : 8 M močovina, 50 mM Tris o pH 8, ethylendiamin 20 mM.

Rozpuštění a úprava na požadovaný objem vodou.

Oxidovaný glutathion 200x : 100 mM ve vodě;

Redukovaný glutathion 200x : 250 mM ve vodě.

Ředící pufr : 600 µM finální PEG 4000 (2,4 g/l), 50 mM Tris-HCl o pH 8, 20 mM NaCl.

Protipěnicí činidlo: Antifoam 0-10 (nikoliv silikonového typu), Sigma.

Příprava PLGF-1 inkluzních tělísek.

Roztoky pro lýzu a promývání byly ekvilibrovány při teplotě místnosti (RT).

Byly provedeny dva cykly zmrazení/roztavení při $-80/37^{\circ}\text{C}$.

Pelety bakterií byly podrobeny lýze v 1 mililitru roztoku pro lýzu na podíl 450 OD600 bakterií.

Potom byla provedena inkubace při teplotě místnosti probíhající po dobu 30 minut a za míchání (250 otáček za minutu).

Roztok byl potom nalit do mixéru o vhodné kapacitě a přidán byl podíl promývacího roztoku 3 mililitry na podíl 450 OD600 bakterií.

V případě potřeby bylo přidáno 0,4 μl neředěného protipěnicího činidla na mililitr vzorku.

Potom byl roztok stáčen při maximální rychlosti po dobu 1 minuty nebo do doby, dokud nebylo dosaženo dobré homogenizace.

Obsah tohoto mixéru byl potom převeden do nádoby o vhodné kapacitě, načež bylo přidáno 6,5 mililitru promývacího roztoku na podíl 450 OD600 bakterií. Inkubace byla potom prováděna po dobu 45 minut při teplotě místnosti a za míchání.

Takto získaná suspenze byla odstřeďována při $13000 \times g$ po dobu 45 minut při teplotě 25°C a supernatant (kapalina nad usazeninou) byl odveden.

Usazené pelety byly potom resuspendovány ve 4 mililitrech promývacího roztoku na podíl 450 OD600 bakterií a cyklus prováděný v mixéru byl podruhé opakován.

Získaná suspenze byla potom převedena do zásobníku o vhodné kapacitě, načež byla zředěna 6,5 mililitry promývacího

roztoku na podíl 450 OD600 a inkubována po dobu 30 minut při teplotě místnosti a za míchání.

Odstředování bylo potom opakováno za stejných výše uvedených podmínek, načež byl eliminován supernatant.

Příklad 3

Renaturace proteinu

Podle tohoto postupu byla inkluzní tělíska solubilizována v 7 mililitrech denaturačního pufru BD (obsahujícího močovinu o koncentraci 8 M) a dále bylo provedeno zředění v BD až do dosažení OD280 0,8. Potom bylo přidáno 0,6 objemu ředícího pufru za účelem dosažení konečné koncentrace močoviny 5 M.

V dalším postupu bylo přidáno 1/200 redukovaného glutathionu 200X (finální koncentrace 1,25 mM) a 1/200 oxidovaného glutathionu 200X (finální koncentrace 0,5 mM). Potom bylo odebráno 15 μ l vzorku pro kontrolu (prererefol) a roztok byl potom inkubován při teplotě 20 °C po dobu 18 až 20 hodin za míchání.

Na konci této inkubace bylo médium odstředováno po dobu 10 minut při teplotě 20 °C při 10000 x g, načež bylo zfiltrováno za pomoci 0,45 nebo 0,8 μ m filtrů a potom bylo odebráno 15 μ l vzorku pro kontrolu (postrefol).

Výsledky : Tyto 15 μ l vzorky odpovídající roztokům pro pre- a post- refolding (znovusestavení struktury proteinu) byly potom analyzovány za pomoci SDS-PAGE elektroforézy (viz obr. 5).

Příklad 4

Anexová chromatografie

Následující postup se týká prvního stupně purifikace PlGF-1 proteinu po refoldingu (znovusestavení struktury proteinu). Po naplnění tohoto vzorku na kolonu by zde mohla nastat

vysoká ztráta neabsorbovaného PLGF-1 monomeru. Plněné množství nesmí proto překračovat desetinásobek objemu kolony, neboť by jinak došlo ke značné ztrátě PLGF-1 dimeru.

Eluování bylo prováděno za isochratických podmínek za použití 20% pufru B (viz dále), což odpovídá koncentraci chloridu sodného NaCl 200 mM. Eluovaný pík stále obsahuje glutathiony použité pro refolding (znovusestavení struktury proteinu), které přispívají asi 50% na OD280.

Materiály a parametry:

FPLC systém : Amersham Biosciences pracující se softwarem označovaným FPLC Director.

Monitorované parametry:

U.V. : vlnová délka = 280 nm; horní bod stupnice = 2;

Teplota : 20 °C (minimum 15, maximum 25);

Pryskyřice : Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences);

Objem/výška kolony : Objem : 1/10 objemu vzorku určeného k plnění; výška : v rozmezí od 13 do 16 centimetru;

Ekvilibrace : 2 objemy kolony (CV) pufru B, potom 1,5 CV pufru A.

Vzorek : renaturovaný, odstředěný a/nebo zfiltrovaný PLGF-1.
Plnění maximálně 10 CV.

Pufr A : 20 mM ethanolamin-HCl o pH 8,5;

Pufr B : pufr A + 1 M NaCl;

Rychlost nástřiku : 1 cm/minutu (maximální rychlost nástřiku testovaná na malých kolonách = 1,887 cm/minutu; minimální testovaná rychlost nástřiku = 0,5 cm/minutu).

Eluční rychlost : 1 cm/minutu (maximální rychlost testovaná na malých kolonách = 1,887 cm/minutu; minimální testovaná rychlost nástřiku = 0,5 cm/minutu).

Promývání po nástřikování : 1,5 CV za použití 0% pufru B.

Získaný pík : pík eluovaný při isochratických podmínkách za použití 20% pufru B, při asi 3 CV.

Konečné promytí : 2 CV za použití 100% B.

Postup :

Podíl odpovídající píku eluovanému za isochratických podmínek za použití 20% pufru B byl odebrán a k němu bylo přidáno 0,271 objemu vody, 0,0045 objemu TFA a 0,225 objemu ethanolu. Tímto způsobem bylo dosaženo 1,5 násobné zředění vzorku, přičemž vzorek obsahoval 15% ethanolu a 0,3% TFA. Přídavek těchto dvou látek usnadnil vázání PlGF-1 na pryskyřici pro chromatografii s reverzními fázemi (viz obrázek č. 5).

Výsledky : Průběh chromatografického stupně byl kontinuálně kontrolován monitorováním optických hustot při 280 nm, jak je znázorněno na obr. č. 2.

Čistota izolovaného proteinového materiálu byla analyzována za pomoci SDS-PAGE elektroforézy (viz obr. č. 5).

Příklad 5

Chromatografie s reverzními fázemi

Následující postup je možno provést za použití pryskyřice RP Source s průměrnou velikostí částic 15 μm (mikronů) nebo 30 μm (mikronů). Ovšem použití pryskyřice RP Source o velikosti částic 30 μm (mikronů), i když nezachytí všechny změny při čistícím procesu, umožňuje ekonomičtější provedení postupu, to znamená ekonomické úspory na pryskyřici jako takové (asi 50%), snadnější provedení procesu plnění kolony a nižší protitlak.

Postup se týká druhé fáze purifikace PlGF-1 proteinu po zpracování na QFF pryskyřici. Během nástřiku vzorku je možno pozorovat vysokou adsorbanci, což odpovídá neadsorbovanému

píku glutathionů, které se nevážou na pryskyřici. Tento postup sestává ze dvou podstupňů, přičemž první podstupeň se označuje RPCmon a je použit k eliminování většiny monomerní složky PlGF-1, přičemž druhý podstupeň se používá k eluování podstatného podílu dimerní komponenty proteinu a označuje se RPCdim.

První podstupeň (RPCmon)

Materiály a parametry:

FPLC systém : Amersham Biosciences pracující se softwarem označovaným FPLC Director;

Monitorované parametry

U.V. : vlnová délka = 280 nm; plná stupnice = 0,05;

Teplota : 20 °C (minimum 15, maximum 25);

Pryskyřice : Reverse Phase Source 30 (Amersham Biosciences).

Objem/výška pryskyřice : Objem : 1/5 až 1/6 celkového OD280 vzorku určeného k plnění do kolony; výška : v rozmezí od 27 do 33 centimetrů.

Ekvilibrace : 2 objemy kolony (CV) pufru B, potom 2 CV pufru A.

Vzorek : PlGF-1 odváděný z předchozího stupně (viz příklad 4), zředěný 1,5 krát a obsahující 15 % ethanolu a 0,3 % TFA.

Plnění maximálně 4,5 až 5,5 OD280 na mililitr pryskyřice.

Pufr A : 40% ethanol + 0,1% TFA;

Pufr B : 70% ethanol + 0,1 % TFA;

Rychlost nástřiku : 1,887 cm/minutu;

Rychlost eluování : 1,887 cm/minutu;

Promývání po nástřiku : 1,5 CV za použití 4% pufru B.

Pík monomeru : Gradient v rozsahu od 4 do 40% B ve 12 CV (3% B/CV). Okamžitě po zahájení eluování tohoto píku při OD280 dosahující 25% plné stupnice bylo eluování prováděno dále za isochratických podmínek s pufrem B o koncentraci dosažené

v tomto okamžiku, dokud eluce píku nebyla úplná (asi 2,5 až 3,5 CV).

Pracovní postup:

Vhodné množství tohoto roztoku odpovídajícího píku „monomeru“ bylo odebráno a tento podíl byl zkoncentrován pro kontrolu („mon“ na obr. č. 5).

Druhý podstupeň (RPCdim)

Materiály a parametry :

Bez nové ekvibrace kolony, ale pouze s posunem rozsahu stupnice UV monitoru na hodnotu 2 byl použit gradient pohybující se v rozmezí od 10 do 100 % pufru B ve 2,2 CV (40,9% B/CV).

Pracovní postup:

Byly odebrány frakce odpovídající píku „dimer“. Na obr. č. 4 je ilustrován příklad těchto frakcí. Tyto frakce byly spojeny, načež byla zjištěn objem a optická hustota při 280 nm tohoto podílu.

Celkový výtěžek (vyjádřený v miligramech) dosažený před lyofilizací byl vypočítán vynásobením OD280 krát objem krát zředění. Celková hodnota tohoto výtěžku byla 164 miligramů čistého PLGF-1 na litr bakteriální kultury, přičemž standardní odchylka byla 23,21. Rovněž je možno jej vyjádřit v miligramech na 1000 OD600 fermentovaných bakterií, čímž se dosáhne hodnoty 5,58 miligramu čistého PLGF-1 na 1000 OD600 fermentovaných bakterií při standardní odchylce 0,8.

Tak zvaný dimerní roztok byl udržován při teplotě -20 °C do ultrafiltrace a lyofilizace. Vzorek tohoto roztoku byl podroben SDS-PAGE elektroforéze, přičemž výsledek je ilustrován na obr. č. 5.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob extrahování a purifikace rekombinantního placentárního růstového faktoru (PLGF) exprimovaného v indukovatelném expresním systému v modifikovaných prokaryotických buňkách zahrnují následující stupně:

- (I) fermentace prokaryotických buněk,
- (II) extrakce a purifikace inkluzních tělísek,
- (III) renaturace exprimovaného proteinu,
- (IV) iontoměničová chromatografie,
- (V) chromatografie s reverzními fázemi,

vyznačující se tím, že stupeň (I) se provádí do dosažení optické hustoty kultivačního média v rozmezí od 1 do 50 při 600 nm (OD^{600} 1 - 50), přičemž následuje indukce, stupeň (II) zahrnuje lýzu kultivačních buněk, narušení DNA a izolování inkluzních tělísek, stupeň (III) zahrnuje solubilizaci inkluzních tělísek v denaturačním pufru, přičemž exprimovaný protein se převede přinejmenším částečně zpět na dimerní formu, a ve stupni (IV) a (V) se dimerní a multimerní forma exprimovaného proteinu oddělí od monomerní formy a izoluje se.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** placentárním růstovým faktorem (PLGF) je PLGF-1 lidského původu nebo zvířecího původu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** prokaryotické buňky jsou bakteriální buňky

4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím, že** stupeň (I) se provádí v médiu umožňujícím získání vysoké bakteriální hustoty při provádění fermentačního stupně a prostém veškerého materiálu živočišného nebo lidského původu.

5. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** stupeň (I) se provádí v médiu obsahujícím jedno nebo více selekčních činidel, kvasnicový extrakt, glycerol a amonné soli.

6. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** indukovatelný expresní systém je expresní systém T7.

7. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** bakteriálními buňkami jsou buňky kmene odvozeného od *E. coli*.

8. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** bakteriálním kmenem je *E. coli* {B121}DE3}pLysS}.

9. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** exprese je indukována za pomoci laktózy, isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) nebo funkčně ekvivalentními analogy.

10. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** optická hustota kultury ve fázi indukce je v rozmezí od 14 do 30 OD při 600 nm (14 až 30 OD⁶⁰⁰).

11. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** stupeň (I) zahrnuje predstupeň preinokulace.

12. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (II) se lýza provádí za použití zmrazení/roztavení, francouzského lisu (tak zvaný „French Press“) nebo jiných ekvivalentních technik.

13. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (II) se narušení DNA provede

za pomoci DNAzy extrakčního nebo rekombinantního původu, výhodně za použití benzonázy, nebo chemicko-mechanickým účinkem.

14. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (II) se narušení DNA provádí za pomoci mixéru.

15. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (II) se inkluzní tělíska izolují za pomoci přinejmenším dvou cyklů odstředování a promývání do vhodného pufru.

16. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (III) se inkluzní tělíska solubilizují do denaturačního pufru obsahujícího močovinu, guanidiniisothiokyanát, guanidin-hydrochlorid nebo libovolné jiné denaturační činidlo a případně jsou homogenizovány nebo zpracovány sonikací.

17. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (III), po solubilizaci inkluzních tělísek, se roztok zředí a proteinový materiál se renaturuje přidáním roztoku oxidačních/redukčních činidel a inkubováním po dobu 10 až 30 hodin, ve výhodném provedení 18 až 20 hodin, při teplotě v rozmezí od 10 °C do 20 °C, a za míchání.

18. Způsob podle nároku 17, **vyznačující se tím, že** se roztok zředí do dosažení optické hustoty při 280 nm (OD^{280}) v rozmezí od 0,01 do 2, ve výhodném provedení 0,5, přičemž oxidační/redukční činidla jsou glutathion redukovaný a oxidovaný v takových podílech a koncentracích, že umožňuje dosáhnout maximální produkce dimerní formy.

19. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** ve stupni (IV) se roztok přicházející z předchozího stupně plní na anexovou kolonu při poměru objem plnění/objem kolony v rozmezí od 1 : 1 do 10 : 1.

20. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím, že** poměr objem plnění/objem kolony je 10 : 1.

21. Způsob podle nároku 19 nebo 20, **vyznačující se tím, že** protein se eluuje za pomoci ethanolamin-HCl, NaCl pufru a dále tento protein v monomerní formě je hlavně obsažen ve frakcích obsahujících materiál, který není vázán na pryskyřici, přičemž protein v dimerní formě je v podstatě obsažen v následujících frakcích eluovaných při NaCl koncentraci v rozmezí od 150 do 250 mM.

22. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** se roztok ve stupni (V) eluovaný v předchozím stupni o koncentraci NaCl od 150 do 250 mM zředí a plní do chromatografické kolony s reverzními fázemi v množství odpovídajícímu optické hustotě od 4,5 do 5,5 OD při 280 nm na mililitr pryskyřice.

23. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím, že** se protein eluuje ve dvou následně prováděných elučních stupních elučním pufrům obsahujícím zvyšující se gradient organického rozpouštědla.

24. Způsob podle nároku 23, **vyznačující se tím, že** se první eluční stupeň provádí za podmínek zvyšujícího se gradientu organického rozpouštědla až do dosažení elučního píku odpovídajícího monomerní formě, dále se pokračuje za isochratických podmínek až do vyčerpání elučního píku odpovídajícího monomerní formě, a dále druhý stupeň se provádí

za podmínek zvyšujícího se gradientu organického rozpouštědla až do dosažení úplné eluce proteinu hlavně v dimerní formě

25. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků 22 až 24, **vyznačující se tím, že** eluční pufr obsahuje ethanol, methanol nebo acetonitril.

26. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků 22 až 25, **vyznačující se tím, že** elučním pufrem je hydroalkoholický roztok obsahující zvyšující se procentuální podíl ethanolu.

27. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků 22 až 26, **vyznačující se tím, že** chromatografie s reverzními fázemi se provádí na pryskyřici s velikostí částic o středním průměru 30 mikronů.

28. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** zahrnuje dodatečný stupeň ultrafiltrace po lyofilizaci prováděný v přítomnosti nebo nepřítomnosti vhodných aditiv.

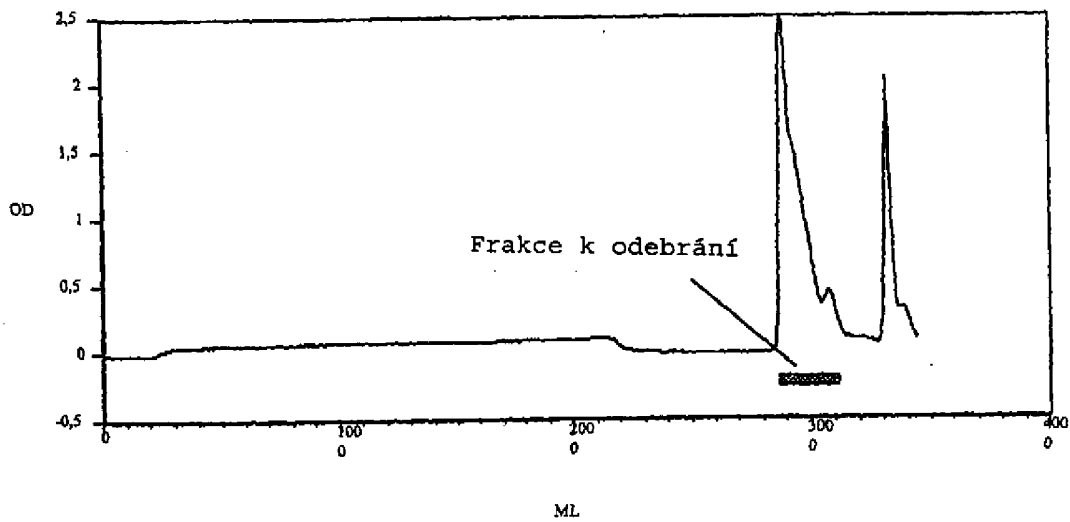
29. Placentární růstový faktor v aktivní formě získatelný za pomoci postupu podle některého z nároků 1 až 25, **vyznačující se tím, že** je v čisté formě zbavený znečišťujících látek hostitelského kmene a obsahuje monomerní formu v procentuálním podílu maximálně 1,5%, přičemž je v podstatě v dimerní a multimerní formě.

Zastupuje:

Dr. Miloš Všetečka

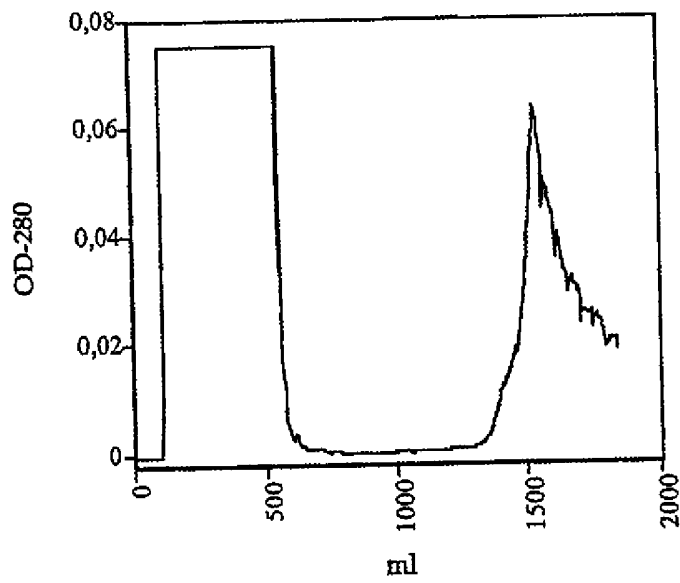
70 1007-892
18.08.04

pryskyřice Q-Sepharose Fast Flow



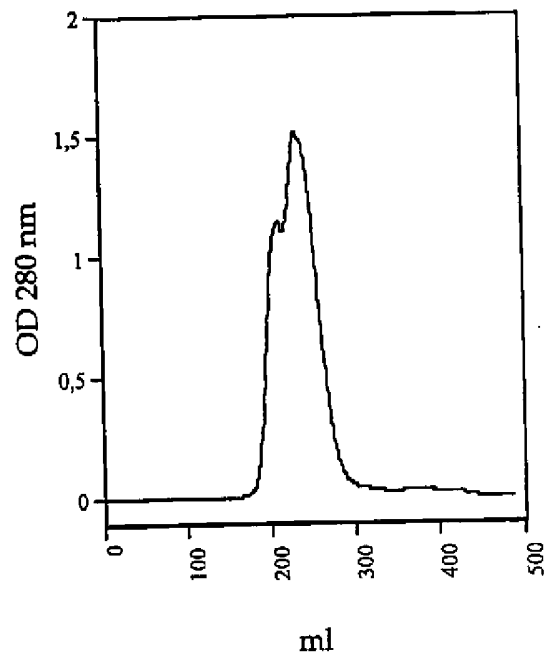
obr 1.
obr. 2

70 2004-892
18.08.04



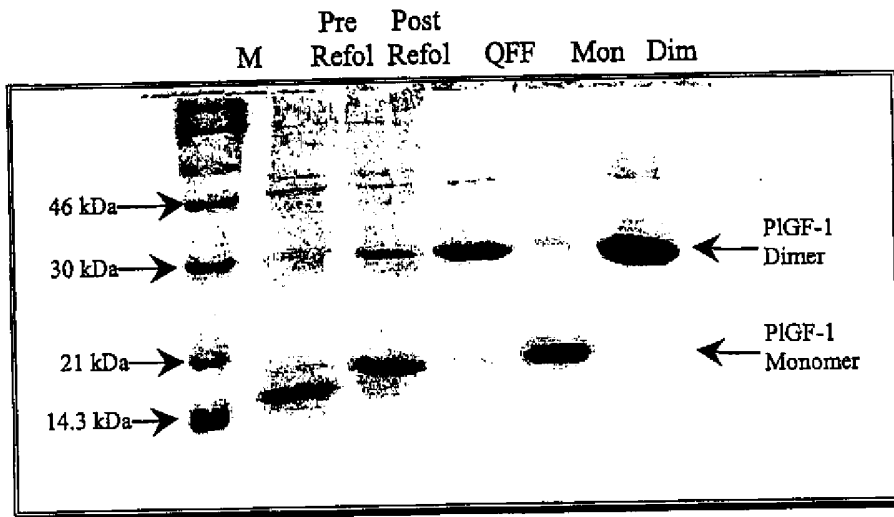
obr. 2
obr. 3

701004-892
18.08.04



obr. 3
~~obr. 4~~

7020024-892
18.08.04



062.4
obr. 5