



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 275 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 21/00
C 07 K 3/12

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 P / 344 157 1 (22) 30.05.88 (44) 13.02.92

(71) siehe (73)

(72) Schmidt, Karl-Hermann, Dr. rer. nat.; Gerlach, Dieter, Dr. rer. nat., DE

(73) Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, (ZIMET), Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE

(74) siehe (73)

(54) Verfahren zur Reindarstellung von Protein A,

(55) Gewinnung von chemisch reinem Protein A; bakterielle Produzenten; Kulturfiltrate von Fermentationsbrühen; 3-Schritt-Verfahren; Einsatz von Trichloressigsäure; Überstand; Ammoniumsulfat-Zugabe; Dialyse; Lyophilisation

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von chemisch reinem Protein A, vornehmlich aus Kulturfiltraten von Fermentationsbrühen bakterieller Produzenten dieses Proteins. Als Anwendungsgebiete des verfahrensgemäß hergestellten Produkts kommen die Biotechnologie (z. B. Isolierung von Antikörpern) sowie die Humanmedizin (Therapeutikum; Diagnostikum) in Betracht. Die Erfindung verfolgt das Ziel, für diese Verwendungszwecke chemisch reines Protein A bereitzustellen. Die dieser Zielstellung zugeordnete Aufgabe wird gelöst, indem man in einem 3-Schritt-Verfahren mit den Stufen

- Abtrennung eines Rohprodukts aus einer Ausgangslösung obiger Kennzeichnung durch Bindung an ein Adsorbentmaterial,
 - Ablösung des Zielprodukts vom beladenen Adsorber unter Einsatz von wenigstens einem organischen Elutionsmittel sowie
 - Isolierung von hochreinem Zielprodukt aus den erhaltenen Eluaten
- in der letzten Stufe den Eluaten Trichloressigsäure zusetzt, den sich bildenden Niederschlag abtrennt sowie aus dem verbleibenden Überstand nach Ammoniumsulfat-Zugabe, nach Dialyse gegen Ammoniumbikarbonat-Puffer und nach Lyophilisation chemisch reines Protein A gewinnt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Reindarstellung von Protein A, ablaufend in den Schritten
 - a) Abtrennung eines Rohprodukts aus Protein A-haltigen Ausgangslösungen, vornehmlich aus den Kulturfiltraten mikrobiologischer Fermentationen, durch Bindung an ein Adsorbiermaterial,
 - b) Ablösung des Zielprodukts vom beladenen Adsorbiermaterial unter Einsatz von wenigstens einem organischen Elutionsmittel sowie
 - c) Abtrennung des Zielprodukts aus den erhaltenen Eluatent, **gekennzeichnet dadurch, daß man**
 - den genannten Eluatent Trichloressigsäure zusetzt und den sich bildenden Niederschlag abtrennt sowie
 - aus dem verbleibenden Überstand nach Ammoniumsulfat-Zugabe, nach Dialyse gegen Ammoniumbikarbonat-Puffer und nach Lyophilisation chemisch reines Protein A isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß man** den genannten Eluatent Trichloressigsäure unter Rühren und/oder Schütteln bis zu einer Endkonzentration von 2% bis 5% zusetzt sowie frühestens 30 Minuten nach Prozeßbeginn den sich bildenden Niederschlag abtrennt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch, daß man**
 - den genannten Eluatent Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 5% zusetzt und
 - dem verbleibenden Überstand Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% zugibt und aus dem hierbei gewonnenen Präzipitat nach Dialyse gegen 0,01 M Ammoniumbikarbonat-Puffer sowie nach Lyophilisation das Zielprodukt isoliert.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch, daß man**
 - den genannten Eluatent Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 2,5% zusetzt und
 - dem verbleibenden Überstand Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% zugibt und aus dem hierbei gewonnenen Präzipitat nach Dialyse gegen 0,02 M Ammoniumbikarbonat-Puffer sowie nach Lyophilisation das Zielprodukt isoliert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bereitstellung von chemisch reinem Protein A, vornehmlich aus Kulturfiltraten von Fermentationsbrühen bakterieller Produzentenstämmen. Protein A ist ein natürlicherweise von vielen Staphylokokken gebildetes zelluläres Protein, welches spezifisch Immunglobuline vom IgG-Typ an ihrem jeweiligen Fc-Abschnitt (Fc-fragment crystalline) zu binden vermag.

Protein A wird in der serologischen Diagnostik als markierte Sonde (Enzym-, Fluoreszenz- oder radioaktive Markierung) für den Nachweis spezifischer Antikörper herangezogen. Weitere Anwendungen liegen in der Möglichkeit, durch an unlösliche Träger kovalent gebundenes Protein A Antikörper – auch monoklonale – zu isolieren. Schließlich liegen auch Ansätze zur therapeutischen Nutzung von trägerfixiertem Protein A bei Autoimmun-Erkrankungen vor.

Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit in der technischen Mikrobiologie; als Anwendungsgebiete des verfahrensgemäß hergestellten Produkts kommen die Biotechnologie (z. B. bei der Isolierung von Antikörpern) sowie die Humanmedizin (Therapeutikum, Diagnostikum) in Betracht.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Verfahren zur Herstellung von Protein A sind seit 1971 bekannt (siehe A. Arvidson et al., Acta Pathol. Microbiol. Scand., 798, 1971, 399). Als native Protein A-Bildner wurden hierbei *Staphylococcus aureus*-Stämme eingesetzt, und zwar zunächst solche Produzenten, in denen das Produkt nahezu vollständig zellwandgebunden vorliegt. Sehr bald konnte für die Biosynthese aber auch *S. aureus*-Stammmaterial eingesetzt werden, welches das Protein A in das Kulturmedium sezerniert (A. Forsgren et al., J. Bacteriol. 107, 1971, 245; G. Masuda et al., Infect. Immun. 2, 1975, 245).

Mit der Arbeit von S. Löfdahl, M. Uhlen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1983, 697 wurde erstmals ein Verfahren bekannt gemacht, in dem rekombinante Mikroorganismen-Stämme, und zwar zunächst *E. coli*-Stämme, zur mikrobiellen Herstellung von Protein A herangezogen worden sind. Inzwischen sind jedoch auch weitere Verfahrenslösungen zur Produktion dieser Substanz unter Rückgriff auf rekombinante Bakterienstämme, so unter Rückgriff auf *Bacillus subtilis*-Stämme, angegeben worden (S. R. Fahnenstock & K. E. Fisher, Appl. Envir. Microbiol., 53, 1987, 379).

In allen bisherigen Verfahren zur Gewinnung von Protein A werden im Aufarbeitungs- bzw. Reinigungsabschnitt ausschließlich affinitätschromatographische Methoden verwendet, wobei die Zielsubstanz an Gamma-Globulin, jeweils fixiert an einen festen Träger, im Neutralbereich gebunden wird und anschließend durch Aziditätserniedrigung auf Werte um pH 3,0 eluiert wird (Feinreinigung mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Gamma-Globulin).

Diese Aufarbeitungs-lösungen sind vergleichsweise ineffektiv, da die in ihnen benutzten Träger erst nach einer speziellen Modifizierung, d. h. nach einem Aktivierungsschritt, einsetzbar sind, weiterhin lediglich eine beschränkte Lebensdauer aufweisen, schwer zu sterilisieren sowie durch bakterielle Verunreinigungen zerstörbar sind. Außerdem ist ihre

Bindungskapazität nicht sehr hoch (1 mg Gamma-Globulin kann theoretisch nur 0,3 mg Protein A binden; nach der Immobilisierung des Globulins kann häufig nur noch ein Bruchteil dieser theoretischen Kapazität genutzt werden), und bei wiederholter Verwendung der Träger ist ein beständiger Schwund ihrer Bindungskapazität zu registrieren.

Weiterhin sind bislang keine 3-Schritt-Aufarbeitungsprozeduren mit den Stufen

- Abtrennung eines Rohprodukts aus einer Ausgangslösung durch Bindung an ein Adsorbiermaterial,
- Ablösung des Zielprodukts vom beladenen Adsorber unter Einsatz von wenigstens einem organischen Lösungsmittel sowie
- Isolierung von reinem Protein A aus den erhaltenen Eluaten

bekannt, bei denen in der letzten Stufe Einzelverfahren angewendet werden, welche in markanter Weise von Besonderheiten im Löslichkeitsverhalten von Protein A (im Vergleich zu dem anderer bisher untersuchter Proteine) ausgehen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, für die erwähnten Verwendungszwecke chemisch reines Protein A in effektiver Weise herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein physikalisch-chemisches Aufbereitungsverfahren zu beschreiben, mit dem aus Protein A-haltigen Ausgangslösungen in technologisch unkomplizierter Weise ein chemisch reines Zielprodukt gewonnen werden kann.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in ihrem Grundzug in einem 3-Schritt-Verfahren mit den Stufen

- Abtrennung eines Rohprodukts aus Ausgangslösungen obiger Kennzeichnung, vornehmlich aus Kulturfiltraten von Fermentationsbrühen bakterieller Protein A-Produzenten, durch Bindung an ein Adsorbiermaterial,
- Ablösung des Zielprodukts vom beladenen Adsorber unter Einsatz von wenigstens einem organischen Elutionsmittel sowie
- Isolierung von hochreinem Protein A aus den erhaltenen Eluaten

in der Weise gelöst, daß den im Mittelabschnitt der Gesamtprozedur gewonnenen Eluaten in der letzten Verfahrensstufe zunächst Trichloressigsäure zugesetzt und der nach Abschluß der (nach dieser Zugabe einsetzenden) Fällungsreaktion entstehende Niederschlag abgetrennt wird. Aus dem nach diesem Abtrennschritt verbleibenden Überstand wird anschließend durch Zugabe von Ammoniumsulfat (Teilschritt a), durch Dialyse des hierbei erhaltenen Präzipitats gegen Ammoniumbikarbonat-Puffer (Teilschritt b), gefolgt von einer Lyophilisation (Teilschritt c), dann chemisch reines Protein A isoliert.

Das voransiehend offenbarte Aufbereitungsverfahren zu chemisch reinem Zielprodukt stützt sich auf den überraschenden Befund, daß Protein A von wäßrigen Lösungen der allgemein als Eiweiß- und Proteinfällungsmittel bekannten Halogenfettsäure Trichloressigsäure (CCl_3COOH) im Unterschied zu allen anderen bisher untersuchten Proteinen nicht zur Sedimentation gebracht werden kann. Die letzte Stufe des o. g. 3-Schritt-Verfahrens hat zuzüglich zur Entfernung der zuvor eingesetzten Elutionsmittel die Abtrennung eventuell noch verbliebener Fremdprotein-Restverunreinigungen zu leisten. Zu diesem Zweck kann in der offenbarten Weise vorteilhaft auf Trichloressigsäure-Zusätze zurückgegriffen werden, denn im Ergebnis des beschriebenen Aufbereitungsverfahrens wird das Zielprodukt Protein A als weiße Substanz erhalten, welche in der SDS-Elektrophorese eine Bande für ein relatives Molekulargewicht von ca. 50000 zeigt (also frei von Verunreinigungen ist).

Die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sind zusätzlich zunächst dadurch gekennzeichnet, daß den im Mittelabschnitt der gesamten Aufarbeitungsvorschrift gewonnenen Eluaten in der letzten Verfahrensstufe unter Rühren und/oder Schütteln Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 2% bis 5% zugesetzt wird; dabei kann frühestens 30 Minuten nach Prozeßanfang mit der Abtrennung des sich bildenden Niederschlags begonnen werden. Aus den jeweils verbleibenden Überständen wird anschließend gemäß dem oben dargelegten Schlußschritt (Ammoniumsulfat-Zugabe, gefolgt von einer Dialyse gegen Ammoniumbikarbonat-Puffer und einer Lyophilisation) das chemisch reine Zielprodukt erhalten.

Gute Aufarbeitungsergebnisse konnten insbesondere dann erreicht werden,

- wenn den genannten Eluaten Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 5% zugesetzt und dem nach der Fällungsreaktion verbleibenden Überstand Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% zugegeben sowie das hierbei erhaltene Präzipitat gegen 0,01 M Ammoniumbikarbonat-Puffer dialysiert bzw.
- wenn den genannten Eluaten Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 2,5% zugesetzt und dem nach der Fällungsreaktion verbleibenden Überstand Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% zugegeben sowie das hierbei erhaltene Präzipitat gegen 0,02 M Ammoniumbikarbonat-Puffer dialysiert wurde.

Weiterhin konnten auffallend gute Aufarbeitungsergebnisse dann erzielt werden, wenn für das verfahrensgemäße Vorgehen auf Protein A-haltige Eluate zurückgegriffen werden kann, die nach dem Verfahren einer prioritätsleich patentierten Erfindung des Zentralinstituts herstellbar sind. Hierbei wird in der Startstufe des o. g. 3-Schritt-Verfahrens die Protein A-Fraktion mit weitporigen Kieselgelen (mit Porengrößen im Bereich von 10 nm bis 50 nm) aus den jeweiligen Ausgangslösungen adsorbiert, und von den beladenen Adsorbentien dieser Spezifität wird, erforderlichenfalls nachdem in einem Waschgang im alkalischen Milieu Fremdproteine eliminiert worden sind, mit einer Lösung eines ein- oder mehrwertigen Alkohols, eines Ketons, eines Amins oder eines Amids für die weitere Aufarbeitung ein Protein A-haltiges Rohprodukt eluiert.

In den einzelnen Schritten des Verfahrens wurde die Protein A-Konzentration dabei jeweils mittels Mancini-Technik unter Verwendung eines 0,5% Schweinenormalserum enthaltenden Agars ermittelt.

Mit der Anwendung der Erfindung werden zusätzlich zum o. g. Hauptbefund die nachstehenden Vorteile gesehen:

- Mit dem dargelegten Verfahren können Protein A-haltige Kulturüberstände bzw. Eluate aller Art (ob trüb, verfärbt oder mit Bakterien verunreinigt) sowie in Volumina aller Größenklassen behandelt werden.
- Das verfahrensgemäß hergestellte Protein A ist insbesondere auch so arm an Spaltprodukten dieser Substanz, daß die Nachschaltung einer Gelfiltration nicht erforderlich ist.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

40 Liter einer nach Fermentation in Hefedialysat-Pepton-Nährboden erhaltenen Kultur von *Staphylococcus aureus* Cowan I/M werden zur Abtötung für 15 Minuten auf 80°C erhitzt. Anschließend wird im Separator die Biomasse abgetrennt. In den Protein A-haltigen Kulturüberstand werden 600 g trockenes weitporiges Kieselgel der Sortenklassifizierung B 1 (Feuchtgewicht 1550 g) bei Zimmertemperatur gegeben und für 30 Minuten bis 60 Minuten eingerührt. Nach dem Abstellen des Rührers setzt sich das beladene Kieselgel B 1 in ca. 5 Minuten quantitativ ab. Der Überstand wird verworfen; das beladene Kieselgel wird intensiv mit Wasser gewaschen und in ein 6-l-Gefäß (etwa Becherglas o. ä.) gegeben. Anschließend wird in 3 Portionen nochmals mit je 2 Liter einer 1%igen Soda-Lösung in 15%igem ethanolischem Wasser bei $\text{pH } 9,0 \pm 0,5$ unter Rühren gewaschen. Die Protein A-Gesamtmenge bleibt dabei gebunden.

Die so erhaltenen 1550 g an beladenem, feuchtem, gewaschenem weitporigem Kieselgel obiger Sortenklassifizierung werden mit 5 Liter 0,05 M Glycin in 50%igem Ethylenglykol-Wasser bei $\text{pH } 10,5$ auf einer Fritte eluiert, und der Durchlauf wird in Portionen zu je 500 ml aufgefangen (das Protein A befindet sich hierbei in den Eluaten 2 bis 5, die anschließend vereinigt werden).

Zu 100 ml des so erhaltenen Glykoeluats, welches 0,4 mg/ml Protein A enthielt, wird Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 5% zugesetzt. Der anfallende Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird mit Wasser auf das 4fache Volumen verdünnt, sein pH-Wert danach auf $\text{pH } 5,1$ eingestellt und dieser Lösung Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% zugesetzt. Das Präzipitat wird nach 24 Stunden bei 4°C zentrifugiert, in 10 ml 0,01 M Ammoniumbikarbonat aufgenommen sowie gegen diesen Puffer gemäß Standardverfahren dialysiert. Nach einer abschließenden Lyophilisation erhält man 30 mg Protein A. Das Produkt war SDS-elektrophoretisch einheitlich bei einem relativen Molekulargewicht von ca. 50000.

Beispiel 2:

100 g beladenes, feuchtes Kieselgel B 1, welches wie in Beispiel 1 gewonnen worden war und an das 0,29 g Protein A gebunden sind, werden mit 3 Portionen (zu je 100 ml) 0,1 M Glycin-Puffer; $\text{pH } 2,0$; enthaltend 6 M Harnstoff, ausgerührt; und die Überstände werden vereinigt.

Dieses Eluat wird zunächst gegen aqua dest. dialysiert und anschließend bis zu einer Konzentration von 2,5% mit Trichloressigsäure gesättigt. Der erhaltene Niederschlag wird abzentrifugiert; zum Überstand wird nach Verdünnen auf das 3fache Volumen Ammoniumsulfat bis zur 70%igen Sättigung zugegeben. Das hierbei entstandene Protein A-haltige Präzipitat wird gegen 0,02 M Ammoniumbikarbonat dialysiert. Nach der abschließenden Lyophilisation wurden 206 mg chemisch reines Protein A gewonnen (entspricht einer relativen Ausbeute von 71%).