

(19)



(10) **LT 3062 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3062**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 3/28,
C12N 15/28,
C12P 21/00**

(21) Paraiškos numeris: **IP118**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 09 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 03 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1994 10 25**

(72) Išradėjas:

**Vladas Bumelis, LT
Ina Ežerskaitė, LT
Večeslav Korobko, RU
Arvydas Janulaitis, LT**

(73) Patento savininkas:

Biotechnologijos institutas FERMENTAS, Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Rekombinantinio žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α gavimo būdas

(57) Referatas:

Šio biotechnologijos srities išradimo esmė yra vaistinių preparatų gamybai skirto homogeninio auglių nekrozės faktoriaus- α baltymo išgryninimo iš mikrobiologinio producento būdas. Šis valymo būdas gali būti naudojamas medicinos ir biochemijos pramonėje, gaminant auglių faktorių- α , skirtą onkologinių ligų gydymui.

Išradimo tikslas yra padidinti preparato valymo išeigą ir sukurti tokią valymo schemą, kad būtų galima apsieiti be aukšto slėgio chromatografijos Phenyl-TSK kolonėlėje. Tai pasiekama valant auglių nekrozės faktorių- α iš mikrobiologinio producento Escherichia coli SG200 50, turinčio rekombinantinę plazmidę pTNF311 Δ ir naudojant sekančius procesus: ląstelių ardymą ir tolesnį baltymo valymą chromatografijomis ant hidrosilapatito, DE-52 celuliozes, Red Sepharose CL-6B ir nudruskinimu ant Sephadex G-25.

Tai yra biotechnologijos srities išradimas ir susijęs su medicininės paskirties homogeninio žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α gavimu, panaudojant bakterijų ląsteles su klonuota plazmide, turinčia žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α geną. Šis būdas skirtas žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α baltymo, naudojamo medicinos ir mikrobiologijos pramonėje, gavimui.

Ribotais kiekiais homogeninis žmogaus auglių nekrozės faktorius- α gaunamas iš žmogaus hematopoetinės kilmės ląstelių (žiūr. Williamson B. D. et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1983, v. 80, p. 5397-5401; EP 0218868, C12P 21/02, C12N 15/00, 1985).

Paskutiniaisiais metais žmogaus auglių nekrozės faktorius- α gaunamas iš mikroorganizmų, sugebančių sintetinti šį baltymą dėka rekombinantinių dezoksiribonukleininųjų rūgščių technologijos (EP 0220966, CO7K 3/20, 1985; US 4677063, C12P 21/00, C12N 15/00; EP 0263518, CO7K 3/18).

Mikrobiologinių producentų panaudojimas įgalina išspręsti žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α baltymo didelių kiekių gamybos problemą ir patenkinti medicinos poreikius.

Pats artimiausias technologiniu požiūriu būdas žmogaus auglių nekrozės faktoriui- α gauti iš *Escherichia coli* K-12 DG95 λ ląstelių, turinčių rekombinantinę plazmidę pAW711, yra sekantis: mikroorganizmų ląstelių suspendavimas 10 mM Tris buferyje (pH 7,0) ir ardymas ultragarsiniu dezintegratoriumi; pirminis valymas, panaudojant DEAE-agarozę joninės jėgos gradientu iki 1 M NaCl, 10 mM Tris buferyje (pH 8,2); tolimesnis valymas aukšto slėgio chromatografijos būdu, panaudojant preparatyvinę phenyl - TSK kolonėlę, nulygsvarintą 0,1 natrio fosfatinu buferiu (pH 7,0)

esant 1,8 M amonio sulfato ir eliuacija mažėjančiu linijiniu amonio sulfato gradientu, 0,1 M fosfatiname buferyje (pH 7,0); nudruskinimas, panaudojant GH-25 (EP 0220966, C07K 3/28, 1985).

5

Pateiktuoju būdu vieno ciklo metu gaunama tik 0,6 mg baltymo (6×10^6 V). Be to, šis būdas riboja žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α iš bakterinio producento biomasės pramoninę gamybą, kadangi ultragarsu galima ardyti tik nedidelius ląstelių kiekius. Procesas nėra technologiškas ir dėl naudojamos aukšto slėgio chromatografijos.

Šio išradimo tikslas - padidinti žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α preparato išeigą bei švarumą ir sukurti ekonomišką technologinę valymo schemą.

15

Tikslas pasiekiamas naudojant sekančią žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α valymo iš bakterinio producento Escherichia coli SG200 50, kuriame auglių nekrozės faktoriaus- α genas klonuotas į plazminę pTNF311A, gautą žinomu būdu (žiūr. TSRS autorinį liudijimą Nr. 1445193), schemą:

20

1. Ląstelių suardymas, esant dideliame slėgiui (Manton-Gaulin arba analogiškas aparatas), temperatūra 3-5°C;

25

2. Nukleino rūgščių pašalinimas, panaudojant DE-52 celiuliozę ("Whatman", Didžioji Britanija), esant 3-5°C temperatūrai;

30

3. Pirminė valymo stadija, panaudojant hidroksilapatitą ("Красный химик", NVS);

4. Chromatografija, panaudojant DE-52 celiuliozę ("Whatman", Didžioji Britanija);

35

5. Afininė chromatografija, panaudojant Red-Sepharose CL-6B ("Pharmacia", Švedija);

5 6. Nudruskinimas, panaudojant Sephadex G-25 ("Pharmacia", Švedija).

10 Visos valymo operacijos, pradedant chromatografija ant hidroksilapatito, atliekamos steriliose sąlygose, panaudojant apirogeninius sorbentus bei buferinius tirpalus.

15 Pateiktas žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α gavimo būdas skiriasi tuo, jog bakterijų ląstelės buvo ardytos, panaudojant didelį slėgį (Manton-Gaulin aparatas), o tai įgalina neribotai maštabuoti procesą. Hidrofobinės aukšto slėgio chromatografijos phenyl-TSK kolonėlėje pakeitimas afinine (Red-Sepharose CL-6B) įgalina vieno ciklo metu gauti iki $2,2 \times 10^{10}$ V preparato veitoj 6×10^6 V (prototipe). Esminiai pakeitimai leidžia 20 neribotai maštabuoti procesą, drauge žymiai padidinti išeigą bei švarumą, o tai svarbu pramoninėje gamyboje.

Pateikto metodo įgyvendinimo pavyzdžiai

25 I pavyzdys.

1.1. Štamo producento ląstelių suardymas Manton-Gaulin aparatu

30 120 g *Escherichia coli* SG200 50 (pTNF311 Δ) biomasės, užšaldytos -70°C temperatūroje, susmulkinama $0,5-1 \text{ cm}^3$ dydžio gabalėliais, sudedama į indą, užpilama 2400 ml 20 mM Tris, turinčiu 200 mM NaCl, pH 7,5, maišoma iki homogeninės suspensijos $3-5^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Gauta 35 suspensija 2-3 kartus leidžiama per Manton-Gaulin aparatą esant $500-600 \text{ kg/cm}^2$ slėgiui. Ekstraktas centrifuguojamas 1 valandą Beckman J2-21 centrifūga

1400 aps/min. Gaunama 2350 ml baltyminio ekstrakto (žiūr. lent.)

1.2. Nukleino rūgščių pašalinimas

5

I gautą baltyminį tirpalą dedama 500 ml DE-52 celiuliozės, praplautos 20 mM Tris, turinčiu 200 mM NaCl, pH 7,5, ir maišoma 15-20 min 3-5°C temperatūroje. Dekantavimo būdu sorbentas atskiriamas nuo baltyminio tirpalo ir pakartotinai praplaunamas 500 ml 20 mM Tris su 200 mM NaCl, pH 7,5. Abu baltyminiai tirpalai apjungiami. Gaunama 2900 ml baltyminio tirpalo.

10

1.3. Chromatografija, panaudojant hidroksilapatitą

15

Gautas baltyminis tirpalas skiedžiamas 3 kartus 20 mM Tris pH 7,0 ir leidžiamas per koloną K45/100 ("Pharmacia", Švedija), užpildytą 1000 ml hidoksilapatito 3-5°C temperatūroje, prieš tai sorbentas praplaunamas 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0. Toliau sorbentas praplaunamas tuo pačiu buferiu, kurio tūris lygus 4-5 sorbento tūriams. Žmogaus auglių nekrozės faktorius- α nuimamas joninės jėgos linijiniu gradientu iki 220 mM Na₂HPO₄, pH 7,0. Eliucijos greitis 500 ml/h. Frakcijos, turinčios žmogaus auglių nekrozės faktorių- α , surenkamos (žiūr. lent. 3). Ši ir visos sekančios stadijos atliekamos steriliose sąlygose.

20

25

1.4. Ultrafiltracija

30

Apjungtos frakcijos po hidroksilapatito ultrafiltruojamos "Minitan" aparatu ("Millipore", JAV). Atliekami penki ciklai. Membranų porų dydis 10000 dąltonų. Naudojamas 20 mM Tris, pH 7,5, buferis.

35

1.5. Chromatografija, panaudojant DE-52 celiuliozę

Po dializės baltyminis tirpalas leidžiamas per koloną K45/100 ("Pharmacia", Švedija), užpildytą 2000 ml DE-52 celulioze, prieš tai sorbentas praplautas 20 mM Tris, pH 7,5, temperatūra 3-5°C.

5

Toliau per sorbentą leidžiamas praplovimo buferis, kol pasiekama bazinė linija, fiksuojama baltymų detekcijos kontroline įranga UV-I tipo ("Pharmacia", Švedija). Eliucija vykdoma joninės jėgos linijiniu gradientu iki 10 140 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5, buferyje. Greitis 2000 ml/h. Frakcijos, turinčios žmogaus auglių nekrozės faktorių- α , apjungiamos. Bendras tūris 3000 ml (žiūr. lent.).

15 1.6. Afininė chromatografija, panaudojant Red-SepharoseCL-6B.

Sorbentas praplaunamas 25 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2 buferiu. Apjungtos frakcijos leidžiamos per koloną K50/40 20 ("Pharmacia", Švedija), pakrautą 300 ml Red-Sepharose CL-6B sorbentu. Per sorbentą leidžiamas praplovimo buferis iki bazinės linijos. Eliucija vykdoma joninės jėgos gradientu iki 1,5 M NaCl, 25 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2. Po to sorbentas toliau plaunamas buferiniu tirpalu, 25 turinčiu 1,5 M NaCl, pH 7,2. Frakcijos, turinčios žmogaus auglių nekrozės faktorių- α apjungiamos. Bendras tūris 1600 ml (žiūr. lent.).

1.7. Ultrafiltracija

30

Apjungtos frakcijos po Red-Sepharose CL-6B ultrafiltruojamos aparatu "Minitan" (Millipore", JAV). Membranų porų dydis 10000 daltonų. Ultrafiltruojama, pasiekiant baltymo koncentraciją ne didesnę kaip 4 35 mg/ml.

1.8. Nudruskinimas kolonoje Sephadex G-25

Naudojama kolona K100/100 ("Pharmacia", Švedija) užpildyta 7500 ml Sephadex G-25 sorbentu, praplautu 100 mM fosfatiniu buferiu turinčiu 200 mM NaCl, pH 7,2. Sukoncentruotas baltyminis tirpalas leidžiamas per sorbentą 400 ml/h greičiu. Frakcijos, turinčios žmogaus auglių nekrozės faktorių- α , apjungiamos. Bendras tūris 800 ml (žiūr. lent.).

II pavyzdys.

10

2.1. Biomasės ląstelių suardymas atliekamas analogiškai 1.1.

Bakterinio producento ląstelėms suardyti naudojant Manton-Gaulin aparatą, slėgis siekia 700-800 kg/cm².

15

2.2. Nukleino rūgštys pašalinamos analogiškai 1.2.

2.3. Chromatografija, panaudojant hidroksilapatitą. Žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α eliucija atliekama joninės jėgos linijiniu gradientu iki 300 mM Na₂HPO₄, pH 7,0.

20

2.4. Ultrafiltracija.

25 Atliekama analogiškai 1.4.

2.5. Chromatografija, panaudojant DE-52 celiuliozę. Eliucija atliekama joninės jėgos linijiniu gradientu iki 200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8,0.

30

2.6. Afininė chromatografija, panaudojant Red-Sepharose CL-6B.

35

Eliucija atliekama joninės jėgos linijiniu gradientu iki 2 M NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, pH 7,2.

2.7. Ultrafiltracija.

Atliekama analogiškai 1.7.

2.8. Nudruskinimas kolonoje Sephadex G-25.

Atliekamas analogiškai 1.8.

5

III pavyzdys.

3.1. Biomassės ląstelių suardymas atliekamas analogiškai

1.1. Bakterinio producento ląstelėms suardyti naudojant
10 Manton-Gaulin aparatą, slėgis siekia 300-400 kg/cm².

3.2. Nukleino rūgštys pašalinamos analogiškai 1.2.

3.3. Chromatografija, panaudojant hidroksilapatitą,
15 atliekama analogiškai 1.3.

3.4. Ultrafiltracija atliekama analogiškai 1.4.

3.5. Chromatografija, panaudojant DE-52 celiuliozę,
20 atliekama analogiškai 1.5.

3.6. Afininė chromatografija, panaudojant Red-Sepharose
CL-6B, atliekama eliuojant joninės jėgos "linijiniu
gradientu iki 1,5 M NaCl, 25 mM Na₂HPO₄, pH 7,2.

25

3.7. Ultrafiltracija atliekama analogiškai 1.7.

3.8. Nudruskinimas kolonoje Sephadex G-25 atliekamas
analogiškai 1.8.

30

Gautas preparatas yra apirogeniškas, sterilus,
homogeniškas elektroforetiniu bei imunocheminiu
požiūriu, biologinis aktyvumas ne mažesnis kaip 3x10⁷
V/mg.

35

Gaunamo žmogaus auglių nekrozės faktoriaus-α preparato
homogeniškumas patvirtintas elektroforezės poliakri-

lamidiniame gelyje, esant natrio dodecilsulfatui, būdu. Automatizuotas sekvenavimas Edmano metodu modifikuotu Čango parodė, jog gautas auglių nekrozės faktoriaus- α preparatas turi vieną polipeptidinę grandinę su Ser-Arg-Thr-Pro-... amino rūgščių seka N-gale.

Pastaroji auglių nekrozės faktoriaus- α seka skiriasi nuo natūralaus tipo, jog N-gale neturi keturių amino rūgščių Val-Arg-Ser-Ser-...

10

Žmogaus auglių nekrozės faktoriaus- α gavimo būdo efektyvumas

Valymo stadija	I pavyzdys		II pavyzdys		III pavyzdys	
	Tiksli- nis bal- tymas mg	Išei- ga %	Tiksli- nis bal- tymas mg	Išei- ga %	Tiksli- nis bal- tymas mg	Išei- ga %
1. Surpernatantas po suardymo ultragarsu	2300	100	2300	100	2250	100
2. Chromatograma, panaudojant hidroksilapatitą	1150	50	1150	50	1100	48,9
3. Chromatograma, panaudojant DE-52 celiuliozę	966	42	828	36	918	40,8
4. Chromatograma, panaudojant Red- Sephrose CL-6B	782	34	414	17,7	595	26,4
5. Nudruskinimas, panaudojant Sephadex G-25	736	32	300	13,5	538	23,9

Preparato biologinis aktyvumas, nustatytas panaudojant pelių fibroblastines ląsteles L929, lygus 3×10^7 V/mg baltymo, prototipe - 1×10^7 V/mg baltymo.

15

Pateiktos technologinės schemos panaudojimas įgalina padidinti žmogaus nekrozės faktoriaus- α išeią iki 32 %, prototipe 30 %, ir vieno ciklo metu gauti $2,2 \times 10^{10}$ V preparato, prototipe 6×10^6 V.

5

Aukšto slėgio chromatografijos pakeitimas įgalina technologiškesnę, tinkamesnę maštavimui valymo schemą.

10

Gautą preparatą galima naudoti kaip biologiškai aktyvią medžiagą ląstelių kultūroms, taip pat vaistinės formos gamybai.

15

20

25

30

35

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Rekombinantinio žmogaus auglių nekrozės faktoriaus-gavimo būdas iš *Escherichia coli* ląstelių, turinčių rekombinantinę plazmidę, chromatografiniuose procesuose naudojant anijonitini sorbentą bei nudruskinimą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad ardo *Escherichia coli* ląstelės SG200-50 su rekombinantine plazmide pTNF311Δ, veikiant aukštam slėgiui, pirminiam gryninimui naudoja hidroksilapatitą ir eliuciją gradientu iki 220-300 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, toliau grynina DE-52 celiulioze, eliucija 20 mM Tris buferiu, turinčiu 140-200 mM NaCl, pH 7,5-8,0, po to naudoja afininę chromatografiją Red-Sepharose CL-6B, eliuciją, naudojant 25 mM Na₂HPO₄, turintį 1,5-2 M NaCl, pH 7,2, preparato pervedimui į natrio fosfatini buferi, pH 7,2, atlieka nudruskinimą Sephadex G-25 kolonoje.