



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2005 050 732 A1 2007.04.26

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2005 050 732.8

(22) Anmeldetag: 22.10.2005

(43) Offenlegungstag: 26.04.2007

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/195 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06108
Halle, DE**

(74) Vertreter:

Wissenbach, G., Pat.-Ass., 06108 Halle

(72) Erfinder:

**Rudolph, Rainer, Prof. Dr., 06120 Halle, DE;
Söhling, Brigitte, Dr., 06120 Halle, DE; Malik,
Ajamaluddin, 06124 Halle, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

WO 00/61 782

Internet-Recherche am 12.05.2006:

www.proteinscienc

e.org.

PETERSON, M. D. BROWN, K.C., MAHRUS, S.:

(u.a.):

**Novel inter-protein crosslink identified in the
GGH-ecotin D137Y dimmer. 2001: In: Protein
Science**

, Vol. 10, S. 1549-1562;

Internet-Recherche am 12.05.2006:

www.protocol-onl

**ine.org./prot/Molecular_Biology/Protein_Expressi
on**

protocol online 2002 bis 2004;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Periplasmatische Produktion therapeutisch relevanter Proteine durch Fusion an Escherichia coli Ecotin**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung natürlich gefalteter rekombinanter Proteine zum Einsatz in der medizinischen Diagnostik und Therapie in einem prokaryontischen Wirtsorganismus. Der Wirtsorganismus enthält eine rekombinante DNA, die für ein Fusionsprotein codiert. Der N-terminale Teil des Fusionsproteins codiert für das Ecotin-Signalpeptid aus Escherichia coli und Ecotin. Der C-terminale Teil des Fusionsproteins enthält die Sequenz des gewünschten rekombinanten Proteins. Die N- und C-terminalen Proteindomänen können dabei durch eine kurze synthetische Peptidsequenz miteinander verbunden sein. Während der Produktion in bakteriellen Wirtszellen wird das Fusionsprotein ins Periplasma sezerniert und es bildet sich die natürliche gefaltete Struktur.



Beschreibung

[0001] Die Notwendigkeit einer industriellen Produktion von rekombinanten Proteinen für die Diagnostik und Therapie ist in den letzten beiden Jahrzehnten stetig gewachsen. Dafür werden Techniken benötigt, mit denen ein Protein in der natürlich gefalteten, biologisch aktiven Form gewonnen werden kann. Viele der in der Therapie benötigten Proteine sind sezernierte Proteine mit mehreren Disulfidbrücken. Für diese Proteine ist die Ausbildung der natürlichen Struktur bei der Herstellung oft problematisch. Unter den reduzierenden Bedingungen in bakteriellen Wirtsorganismen fallen diese Proteine in der Regel als Einschlusskörper (inclusion bodies) aus. Es müssen daher geeignete Rückfaltungsverfahren etabliert werden, die die in vitro Renaturierung erlauben. Andernfalls kann alternativ eine Herstellung im bakteriellen Periplasma, ein von der inneren und äußeren Membran begrenzter Raum in Gram-negativen Bakterien, erfolgen.

Stand der Technik

[0002] Im oxidierenden Milieu dieses Kompartiments werden die Disulfidbrücken geknüpft, so dass die sekretierten Proteine eine natürlich gefaltete, native Struktur ausbilden. Die Freisetzung aus dem Periplasma erfolgt durch osmotischen Schock mit anschließender Aufreinigung. Eine Produktion der natürlich gefalteten Proteine in eukaryontischen Wirtsorganismen ist vergleichsweise aufwendig und kostenintensiv.

[0003] Für die Sekretion ins Periplasma ist ein Translokationssignal erforderlich, eine kurze bakterielle N-terminale Signalsequenz, die nach Translokation durch wirtseigene periplasmatische Signalpeptidasen abgespalten wird (Danese und Silhavy, 1998). Jedoch werden viele Proteine mittels der kurzen bakteriellen Signalpeptide nicht oder nur unzureichend sekretiert. So ist bekannt, dass stark basische N-termini mit mehreren Arginin-Resten die Translokation verhindern (Summers et al., 1989).

[0004] Es ist möglich, dieses Sekretionsproblem durch die Verwendung von Fusionsproteinen zu umgehen. Hierbei wird das rekombinante Protein mit einem bakteriellen periplasmatischen Protein oder einer N-terminalen Domäne desselben fusioniert. Proteinfusionen werden in der rekombinanten Proteinproduktion sehr häufig angewandt. Es stehen jedoch wenig Fusionsproteine für die Produktion im Periplasma zur Verfügung.

[0005] Bekannt als Fusionspartner für verbesserte Sekretion und Löslichkeit rekombinanter Proteine ist das Maltose-Bindeprotein aus *E. coli* MalE (di Guana et al., 1988). Das MalE Proprotein wird im Cytoplasma vom Sekretionsfaktor SecB in ungefaltetem Zustand gehalten (Liu et al., 1989). Mit MalE fusionierte Zielproteine zeigen daher verbesserte Sekretionseigenschaften. MalE selbst hat jedoch bereits eine Masse von 41 kDa, die bei der Fusion mit Proteinen großer Masse zu Schwierigkeiten führen kann.

[0006] Ein weiterer bekannter Fusionspartner ist das *Staphylococcus* Protein A (31 kDa), welches alternativ als Fusionspartner eingesetzt werden kann. Bei Expression in Gram-positiven Wirtsorganismen wird das Fusionsprotein in das umgebende Medium sezerniert, für die Expression in *Escherichia coli* wurden cytoplasmatische und periplasmatische Varianten verwendet (Nilsson et al., 1985). Eine verkürzte Variante (14 kDa), codiert nur für das Signalpeptid sowie zwei synthetische IgG-bindende Z-Domänen (Moks et al., 1987). Das entsprechende Fusionsprotein kann aus dem Periplasma (Hellebust et al., 1998) oder aus dem Kulturmedium gewonnen werden (Mergulhao et al., 2004; Moks, et al., 1987).

[0007] Die Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma wird durch Disulfid Oxidoreduktasen bzw. Isomerasen katalysiert und kontrolliert (Raina und Missiakas, 1997; Rietsch und Beckwith, 1998), deren wichtigste Komponente ist die Disulfid Oxidoreductase DsbA (20 kDa). Auch DsbA selbst kann als N-terminaler Fusionspartner zur periplasmatischen Proteinproduktion eingesetzt werden und die Ausbeuten verbessern (Collins-Racie et al., 1995; Winter et al., 2000).

[0008] Barnase (12 kDa), eine enzymatisch inaktive Variante der extrazellulären RNase aus *Bacillus amyloliquefaciens* wird bei Expression in *Escherichia coli* ins Periplasma und ins Nährmedium sezerniert und kann als Fusionsdomäne für die native, sekretorische Produktion von Cystin-Knoten Peptiden eingesetzt werden (Schmoldt et al., 2005).

[0009] Nachteilig für alle bisher bekannten Systeme ist, dass sich viele Proteine mit den verfügbaren Fusionsproteinen nur unzureichend produzieren lassen. Der Erfindung lag somit die Aufgabe zu Grunde ein neues periplasmatisches Fusionsprotein zu entwickeln, welches mit guter Ausbeute exprimiert und mit hoher Effizienz sekretiert, wobei die Eigenschaften des gewählten N-terminalen Fusionspartners entscheidend sind. Erforderlich ist, dass diese N-terminale Domäne über eine hohe Stabilität verfügt und leicht zur nativen Struktur faltet.

Ihre Struktur darf die Faltung des Zielproteins nicht behindern, sondern soll diese fördern. Darüber hinaus ist dieser Teil des Fusionsproteins möglichst klein zu halten, so dass es möglich ist, auch größere Zielproteine als Fusionen zu exprimieren.

Aufgabenstellung

[0010] Erfindungsgemäß wurde das Problem dadurch gelöst, dass ein Fusionsprotein entwickelt wurde, dessen N-terminale aus Ecotin besteht. Ecotin ist ein periplasmatisches Protein aus *Escherichia coli* (Chung et al., 1983), und ein potenter Inhibitor einer Vielzahl von Serin-Proteasen. Es bildet durch mehrere zentrale antiparallele β -Faltblätter eine sehr stabile Tertiärstruktur aus (Fig. 1). Die primären und sekundären Wechselwirkungen mit Trypsin oder anderen Proteasen erfolgen an zwei benachbarten Loopstrukturen auf der Oberfläche. Das Protein dimerisiert durch "domain swapping" der C-terminalen Domänen. Die freien C-Termini ragen aus dem Dimer in entgegengesetzter Richtung heraus (McGrath et al., 1995). Durch Mutagenese gezielter Oberflächenreste wurden aus Ecotin bereits Protease-Inhibitoren mit veränderter Spezifität entwickelt und selektiert (Stoop und Craik, 2003; Wang et al., 1995).

[0011] Gemäß Anspruch 1 wird mittels bekannter molekularbiologischer Techniken ein Fusionsprotein mit der Aminosäuresequenz für die Ecotin-Signalsequenz, für Ecotin, und das rekombinante Protein konstruiert. Eine vorteilhafte Ausführung stellt die Generierung einer kurzen Peptidsequenz, beispielsweise eine Folge von sechs Glycin-Serin Resten, zwischen Ecotin und dem rekombinanten Protein (vgl. Fig. 2A) dar. Eine weitere beinhaltet die Verbindung beider Proteine durch eine Peptidsequenz, die eine gezielte Abspaltung mittels einer Protease ermöglicht. Hier sind inhibitorisch inaktive Ecotin-Varianten vorteilhaft. Eine weitere Ausführung stellt ein entsprechendes monomeres Fusionsprotein dar, das bevorzugt durch eine Insertion von Ala-Asp-Gly nach Trp130 (Eggers et al., 2001) oder auch durch C-terminale Verkürzung des Proteins um 10 Aminosäuren (Pál et al., 1996) hergestellt wird.

[0012] Das erfindungsgemäße Verfahren wird zur Herstellung therapeutisch relevanter disulfidverbrückter Proteine, u. a. von Aspartat-Proteasen, eingesetzt. Aspartat-Proteasen haben Schlüsselfunktionen bei der Entstehung vieler Krankheiten. So ist bekannt, dass Aspartat-Proteasen an der Prozessierung des Alzheimer Peptids (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999) an der Kontrolle von Blutdruck und Elektrolythaushalt (Suzuki et al., 2004), an der Prozessierung des HIV-1 gag Polyproteins zu den viralen Matrix- und Strukturproteinen (Erickson-Viitanen et al., 1989) beteiligt sind. Lysosomale und endosomale Aspartat-Proteasen kontrollieren den zellulären Proteinstoffwechsel und sind an Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche beteiligt (Conner, 2004; Hewitt et al., 1997; Maric et al., 1994). So wird Cathepsin D als prognostischer Marker bei der Tumorentstehung eingesetzt (Scorilas et al., 1999). Pepsin und seine Proform dienen als Serum-Marker für die Diagnostik schwerer atrophischer Gastritis und Magenkrebs.

[0013] Aspartat-Proteasen sind sezernierte Proteine, die in den eukaryontischen Zellen als Proproteine synthetisiert und später zur aktiven Protease prozessiert werden. Sie enthalten mehrere konservierte Disulfidbrücken. Mit Ausnahme der HIV Protease fallen alle bislang in mehrere konservierte Disulfidbrücken. Mit Ausnahme der HIV Protease fallen alle bislang in Bakterien produzierten Aspartat-Proteasen intrazellulär als inclusion bodies aus. Ein mögliches Renaturierungsverfahren unter alkalischen Bedingungen wird in US Patent 6,583,268 beschrieben (Lin, 2003). Es verläuft jedoch nicht für alle Aspartat-Proteasen erfolgreich. Das erfindungsgemäße Verfahren der nativen Expression im Periplasma stellt somit eine echte Alternative dar.

[0014] Unter den Aspartat-Proteasen sind Pepsin und seine Proform Pepsinogen am besten untersucht. Ziel war daher, dieses Protein als Modellprotein für Aspartat-Proteasen in seiner natürlichen disulfidverbrückten Form im bakteriellen Periplasma zu produzieren. Bei Verwendung kurzer bakterieller Signalpeptide konnte keine Sekretion von Pepsinogen ins Periplasma nachgewiesen werden, statt dessen kam es zur Bildung von inclusion bodies. Durch Fusion von Pepsinogen an das periplasmatische Protein Ecotin dagegen lässt sich natives Pepsinogen im Periplasma nachweisen. Das resultierende Fusionsprotein faltet im Periplasma zur natürlichen, disulfidhaltigen Struktur, und kann in dieser Form aus dem Periplasma aufgereinigt werden. Aus dem Fusionsprotein kann die Protease Pepsin nach Aktivierung autokatalytisch gespalten werden.

[0015] Des Weiteren wurde ein Verfahren zur Isolierung von nativem disulfidverbrückten Proteinen aus dem Periplasma entwickelt. Ein Problem ist, dass das rekombinante Protein während der Produktion im Periplasma aber auch bei der Aufarbeitung oxidativ missfalten kann, d.h. es entstehen intramolekulare oder intermolekulare unnatürliche Disulfidbrücken, die die Gesamtausbeute verringern. Aus USP 6,455,279 ist bekannt, dass die Ausbeute an natürlich gefaltetem, disulfidverknüpften Protein durch den Zusatz niedermolekularer Thiolreagenzien ins Nährmedium erhöht werden kann (Glockshuber et al., 2001).

[0016] Die Präparation von bakteriellem Periplasma erfolgt in der Regel durch osmotischen Schock. Die Bakterienzellen werden kurzzeitig in einer Pufferlösung mit hohem osmotischen Wert inkubiert und anschließend in ein Medium niedriger Osmolarität, z.B. Wasser, verdünnt. Erfindungsgemäß wurde ein Verfahren entwickelt, in welchem die Bildung unnatürlicher Disulfidbrücken während des osmotischen Schocks durch den Zusatz niedermolekularer Thiole unterdrückt wird. Während des osmotischen Schocks kommt es (insbesondere bei der Verarbeitung großer oder gefrorener Zellmassen) immer auch zur partiellen Lyse. Cytoplasmatische Proteine werden freigesetzt und bilden unnatürliche Disulfid-Heterodimere mit den periplasmatischen Proteinen. In dem erfindungsgemäßen Aufschlussverfahren wird durch den Zusatz von 1 mM oxidiertem und reduziertem Glutathion die Bildung unnatürlicher intra- und intermolekularer Disulfidbrücken wirkungsvoll unterdrückt. So kann in drei Reinigungsschritten homogenes Protein gewonnen werden (**Fig. 4A**) während der Ansatz ohne Glutathion inhomogenes Produkt liefert (**Fig. 4B**).

[0017] Eine Fusion aus Ecotin und humanem Proinsulin dient als ein weiteres Beispiel für die native periplasmatische Produktion eines therapeutisch bedeutenden, disulfidverbrückten Proteins. Proinsulin ist die biologische Vorstufe für Insulin, ein Peptidhormon mit blutzuckersenkender Wirkung. Natives Proinsulin besteht aus 86 Aminosäuren mit drei Disulfidbrücken (**Fig. 6**). Bei der Prozessierung zu Insulin wird aus Proinsulin ein Polypeptid, das sog. C-Peptid (connecting peptide) herausgespalten. Die verbleibenden N- und C-terminalen Polypeptide werden als B- und A-Kette von Insulin bezeichnet. Sie enthalten die in der Proform gebildeten Disulfidbrücken, wobei zwei der Disulfidbrücken die A- und B-Ketten intermolekular miteinander verbinden, während die dritte Disulfidbrücke zwei Cysteine der A-Kette intramolekular miteinander verknüpft. Proinsulin wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Pankreas synthetisiert, wo in den sekretorischen Granula durch Furin/Prohormonconvertasen diese Prozessierung zum Insulin stattfindet.

[0018] Die Disulfidbrücken im Proinsulin sind nicht linear angeordnet (**Fig. 6**). Die rekombinante Herstellung im Periplasma von *E. coli* in nativer Form ist schwierig, da das Protein leicht aggregiert, nur unvollständig sezerniert und durch Proteasen abgebaut wird (Kang und Yoon, 1994; Mergulhao, et al., 2004; Schäffner et al., 2001; Winter, et al., 2000).

[0019] Erfindungsgemäß wird Proinsulin mit Ecotin fusioniert (Beispiel 5). Nach Expression in *E. coli* BL21(DE3) ist das Fusionsprotein in der löslichen Periplasmafraktion. Ein Hexahistidintag zwischen beiden Proteindomänen kann zur Aufreinigung genutzt werden. Nach Periplasma-Aufschluss und Ni-Affinitätschromatographie wird mit Thrombin gespalten. Die Thrombin-Schnittstelle liegt in der Peptidlinker-Region zwischen beiden Proteindomänen (**Fig. 7A**) und führt zur Abspaltung von Ecotin. Im Gegensatz zu anderen Serin-Proteasen wird Thrombin durch Ecotin nur geringfügig inhibiert. Natives Proinsulin (korrekte Disulfidverbrückung) wird nachfolgend im ELISA quantifiziert, die Identität durch HPLC und Massenspektrometrie bestätigt.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

Konstruktion eines Ecotin-Pepsinogen Fusionsproteins

[0020] Um humanes Pepsinogen an Ecotin zu fusionieren, wird das Gen für *E. coli* Ecotin einschließlich seiner Signalsequenz (GenBank M60876) aus chromosomaler DNA von *E. coli* JM83 mit den Oligonucleotiden Ecotin-Fwd (5'-TTC TAA GAA TTC GAA GGA GAT ATA CAT AAT GAA GAC CAT TCT ACC TGC A-3') und Ecotin-GS-Rev (5'-ATC TTA TCC GGA ACC AGA ACC AGA ACC ACG AAC TAC CGC ATT GTC AAT TT-3') amplifiziert. Humanes Pepsinogen A wird aus pHQPEX-30-5 mit den Oligonucleotiden GS-Peps-Fwd (5'-GTT ATA TCC GGA TCT GGT TCT GGT TCT GGT TAC AAG GTC CCC CTC A-3') und Peps-His-Rev (5'-GTA TAT GTC GAC TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG AGC CAC GGG GGC CAG ACC-3') amplifiziert. Beide Fragmente werden in pCR-Blunt II-TOPO kloniert. Nach Restriktionsspaltung mit EcoRI und BspE1 (Ecotin-Fragment) bzw. BspE1 und Sall (Pepsinogen-Fragment) entsteht durch Ligation beider PCR-Fragmente das Gen für ein Fusionsprotein, bei dem Ecotin und Pepsinogen über 12 Glycin-Serin-Reste in Folge miteinander verbunden sind (**Fig. 2A**). Das Gen wird über EcoRI und BspE1 in den Expressionsvektor pTrc99a einkloniert. Das resultierende Plasmid wird mit pEGP1 bezeichnet.

Beispiel 2

Expression des Ecotin-Pepsinogen Fusionsproteins

[0021] Das Plasmid pEGP1 wird in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Aus einer Übernacht-Kultur bei 37°C wird

2% in 20 ml LB Medium mit 100 mg L^{-1} Ampicillin überimpft (37°C , 140 rpm). Die Induktion der Produktion des Fusionsproteins erfolgt bei einer Optischen Dichte von 0,5–0,7 durch Zusatz von 1 mM IPTG. Eine Inkubationszeit von 4 h bei 24°C eignet sich für die Produktion von nativem Fusionsprotein bevorzugt.

[0022] Für die Analyse des Periplasmas wird ein Aufschluss durch osmotischen Schock durchgeführt. Pro ml Kultur einer optischen Dichte von 1,0 wird ein Periplasma-Extrakt mit einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ in 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 erhalten.

[0023] Der Nachweis von Pepsinogen im Periplasma-Extrakt erfolgt durch Bestimmung der proteolytischen Aktivität. Aus der Ecotin-Pepsinogen-Fusion wird unter sauren Bedingungen Pepsin abgespalten, dessen proteolytische Aktivität anhand der Spaltung von enhanced green fluorescent protein (EGFP) bestimmt werden kann (Malik et al., 2005). Zur Prozessierung von Pepsinogen wird der Extrakt zunächst auf 37°C temperiert, mit 0,1 Volumen 1 M Citrat pH 2,0 versetzt und 10 min inkubiert. Die Proteolyse von säuredenaturiertem EGFP ($11 \mu\text{g}$) erfolgt mit $50 \mu\text{l}$ Protease bzw. Periplasma-Extrakt. Unter den oben beschriebenen Anzuchtbedingungen wird pro mL Bakterienkultur einer Optischen Dichte von 1,0 wurden ca. 100 ng natives Fusionsprotein (70 ng Pepsinogen) erhalten.

[0024] Für Produktion des Fusionsproteins im Fermentor wird ein Komplexmedium (0,5% Glucose, 5% Hefeextrakt, 1,1% KH_2PO_4 , 0,05% NH_4Cl , 0,068% MgCl_2) verwendet. Das Kulturvolumen beträgt 8 L. Die Fermentation wird zunächst bei 37°C und pH 7,0 geführt, bis zum vollständigen Glucose-Verbrauch (Optische Dichte 18,7). Dann wird die Produktion des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Temperatur wird auf 24°C reduziert. Während der weiteren Fermentation für 5 h wird eine Feeding-Lösung aus 30% Hefeextrakt und 25% Glycerin mit einer kontinuierlich ansteigenden Rate von $1,5\text{--}4,5 \text{ ml min}^{-1}$ zugesetzt. Nach 5 h werden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die erhaltene Biomasse beträgt ca. 600 g (OD 45).

Beispiel 3

Periplasma-Aufschluss und Reinigung des Ecotin-Pepsinogen Fusionsproteins

[0025] 30 g gefrorene Biomasse werden mit 30 ml einer Pufferlösung aus 50% Saccharose, 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 9,0 vollständig resuspendiert. Die Zellmasse wird für 2 h bei 4°C langsam gerührt (500 rpm) (Rathore et al., 2003). Anschließend erfolgt ein osmotischer Schock durch Zugabe von 300 ml dest. Wasser (0°C), und weiteres Rühren bei 4°C für 2 h. Protoplasten und unlösliche Zellbestandteile werden nachfolgend durch Zentrifugation 15 min, $10.000 \text{ g } 4^\circ\text{C}$, abgetrennt.

[0026] Das bekannte Verfahren wird wie folgt modifiziert:

- 1.) Um eine Aggregation und Missfaltung des rekombinanten Proteins während des Periplasma-Aufschlusses zu verhindern, werden im hier beschriebenen Aufschlussverfahren niedermolekulare Thiole, vorzugsweise Glutathion zugesetzt: Die o.g. Pufferlösung und das destillierte Wasser werden jeweils 1 mM oxidiertem und reduziertem Glutathion supplementiert.
- 2.) Nach osmotischem Schock und Zentrifugation wird der Überstand mit 6 mM MgCl_2 versetzt und mit $6 \mu\text{l}$ (500 U/ μl) Benzonase (Merck) für 45 min bei 25°C inkubiert.
- 3.) Für die nachfolgende Ni-NTA Chromatographie wird der Periplasma-Extrakt bei 4°C gegen 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl pH 8,0 dialysiert. Nach Zusatz von 10 mM Imidazol werden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert ($10.000 \text{ g } 20 \text{ min}$). Der Überstand (ca. 360 ml) wird durch eine $0,45 \mu\text{m}$ Membran filtriert.

[0027] Der Periplasmaextrakt wird mit 40 ml äquilibriertem His-Bind Gel (Novagen) versetzt. Die Suspension wird bei 4° für 4 h langsam gerührt (100 rpm). Anschließend wird das sedimentierte Gelmaterial mit drei Volumina 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch 3 Volumina 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0.

[0028] Die eluierten Fraktionen werden vereinigt, gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert, und zentrifugiert (20.000 g , 20 min, 4°C). Der Überstand wird filtriert ($0,2 \mu\text{m}$). Je 50 ml werden mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} auf 5 ml HiTrapQ HP (Amersham) gegeben. Die Säule wird mit 70 ml des o.g. Puffers gewaschen. Die Elution erfolgt durch einen zweistufigen Gradienten ($45 \text{ ml } 0\text{--}30\% \text{ NaCl}$ mit $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, und $5 \text{ ml } 30\text{--}100\% \text{ NaCl}$ mit 1 ml min^{-1}) im o.g. Puffer.

[0029] **Fig. 3** zeigt Proben der Aufreinigung. Das Fusionsprotein (58 kDa) ist bereits im Periplasma-Extrakt (Spur 1) erkennbar. Wird der Extrakt mit 0,1 Vol Citrat pH 2,0 versetzt, erfolgt Proteolyse (Spur 9). Proben nach Ni-NTA Chromatographie (Spur 3 und 4) zeigen eine deutliche Anreicherung des Fusionsproteins. Während

der anschließenden Dialyse verbleiben ca. 70% im Überstand, während 30% als Aggregat ausfallen. Nach Anionenaustausch-Chromatographie und HiTrapQ ist die Ecotin-Pepsinogen-Fusion bereits deutlich angereichert (ca. 73% homogen, Spur 8).

[0030] Nach HiTrapQ Chromatographie werden entsprechende Fraktionen vereinigt und durch Gelfiltration an Superdex G-75 (Amersham) in Gegenwart von 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7,5 bei einer Flussrate von 2 ml min⁻¹ aufgetrennt. **Fig. 4** zeigt Fraktionen der abschließenden Gelfiltration. In **Fig. 3A** wurde als Ausgangsmaterial für die Reinigung ein Periplasma-Aufschluss in Gegenwart von 1 mM oxidiertem und reduziertem Glutathion (s.o.) durchgeführt. In **Fig. 3B** wurde ein identisches Reinigungsprotokoll verwendet, Ausgangsmaterial war jedoch ein Periplasma-Aufschluss in Abwesenheit von Thiolen. In Gegenwart von Thiolen (**Fig. 4A**) liegt nach der Gelfiltration homogenes Fusionsprotein vor, in Abwesenheit von Thiolen (**Fig. 4B**) wird das cytoplasmatische SlyD Protein (21 kDa) mit aufgereinigt.

[0031] Tabelle 1 zeigt das Reinigungsprotokoll in der Übersicht. Nach Aufschluss von 30 g Biomasse enthält der Periplasma-Extrakt ca. 600 mg Gesamtprotein. Nach Dialyse und Ni-NTA-Chromatographie verbleiben 47 mg, nach HiTrapQ 11,5 mg. Das Fusionsprotein liegt nun bereits in nahezu homogener Form vor (vgl. **Abb. 2**, Spur 8). Durch abschließende Gelfiltration werden 5,2 mg vollständig homogenes Präparat erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 22,9%.

Beispiel 4

Prozessierung des gereinigten Ecotin-Pepsinogen Fusionsproteins zu Pepsin

[0032] Die Prozessierung des Ecotin-Pepsinogen-Fusionsproteins zu Pepsin erfolgt säurekatalysiert. Das Fusionsprotein (30 µg/ml) wird mit 0,1 Vol. 1 M Citrat pH 2,0 versetzt und bei 37°C inkubiert. **Fig. 5** zeigt Proben der Prozessierung; nach unterschiedlicher Inkubationszeit. Die N-terminale Domäne (Ecotin) ist bereits nach 30 Sekunden vollständig abgebaut, die entstehenden Spaltprodukte entsprechen Pepsinogen (40 kDa) und Pepsin (34 kDa). Erst nachfolgend wird das entstandene Pepsinogen vollständig zu Pepsin prozessiert.

Beispiel 5

Konstruktion des Ecotin-Proinsulin Fusionsproteins

[0033] Humanes Proinsulin wird aus pDSBA3-PI (Winter, et al., 2000) mit den Oligonucleotiden PI-Fwd (5'-GGT TCC GAT CTG GTT CTG GTT CTC TGG TCC CCC GCG GTA GTC ACC ACC ACC ACC ACC GTT TTG TGA ACC AAC ACC TGT GCG GC-3') und PI-Rev (5'- AGT GTC GAC TTA GTT GCA GTA GTT CTC CAG CTG GTA-3') amplifiziert und in pCR-Blunt II-TOPO kloniert. Nach Restriktionsspaltung mit BspE1 und Sall wird das Pepsinogen-Fragment in pEGP1 durch das entsprechende Proinsulin-Fragment ersetzt. Das resultierende Plasmid wird mit pEGP11 bezeichnet.

Beispiel 6

Produktion des Ecotin-Proinsulin Fusionsproteins

[0034] Das Plasmid pEGP11 wird in E. coli BL21(DE3) transformiert. Aus einer Übernacht-Kultur bei 37°C wird 1% in 1 L LB Medium mit 100 mg L⁻¹ Ampicillin überimpft (37°C, 140 rpm). Die Induktion der Produktion des Fusionsproteins erfolgt bei einer Optischen Dichte von 0,5–0,7 durch Zusatz von 1 mM IPTG. Eine Inkubationszeit von 4 h bei 24°C eignet sich für die Produktion bevorzugt. Aus 4 L Kultur werden ca. 15 g Biomasse erhalten.

[0035] Der Periplasma-Aufschluss erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben. Auf den Zusatz von Glutathion wird verzichtet. Die Vorbereitung der Ni-Affinitätschromatographie erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben. Die Chromatographie wird an 15 ml Ni-NTA Agarose in 50 mM Tris, 10 mM Imidazol, pH 8,0 durchgeführt bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Elution erfolgt mit 0–100% NaCl. Der Nachweis von Proinsulin erfolgt durch ELISA (Winter, et al., 2000). Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt und gegen 50 mM Tris, 300 mM NaCl pH 8,0 dialysiert. Ecotin ist ein dimeres Protein, so dass auch das Fusionsprotein zunächst als Homodimer vorliegt. Die Abspaltung von Ecotin erfolgt durch Thrombin. Es wird monomeres Proinsulin frei. Die Spaltung erfolgt bei Raumtemperatur für 2 h. Nach Zusatz von PMSF und 10 mM Imidazol wird 30 min bei 4°C und 25000 Upm zentrifugiert.

[0036] Der Hexahistidin-tag Er befindet sich nach Spaltung mit Thrombin im N-Terminus von Proinsulin. Er kann nun genutzt werden, um Proinsulin und Ecotin zu trennen. Die Proteinlösung wird erneut auf die Ni-NTA-Agarose aufgetragen, die Elution von Proinsulin erfolgt in 250 mM Imidazol. Die Fraktionen werden im ELISA analysiert. Das spezifische Signal im ELISA ist nun nahezu verdoppelt. Es liegt natives monomeres Proinsulin vor. Die Identität wird durch HPLC und Massenspektrometrie bestätigt.

Fig. 1: Ecotin (Escherichia coli Trypsin Inhibitor, 16 kDa)

[0037] Dargestellt ist die Struktur des dimeren Proteins. Die C-terminalen Domänen beider Untereinheiten bilden zusammen ein antiparalleles β -Faltblatt, die C-termini (C bzw. C') zeigen in entgegengesetzte Richtungen. Die letzten 4 Aminosäuren (139–142) sind rechtwinklig zum β -Faltblatt angeordnet. Die Bindung von Serin-Proteasen erfolgt an den flexiblen Loopstrukturen, die in der Abb. nach oben und unten aus dem Dimer herausragen. Die Abbildung wurde mit Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>) mit IECZ aus der PDB Proteindatenbank erstellt.

Fig. 2: Ecotin-Pepsinogen Fusionsprotein

[0038] Die Aminosäuren 1–20 entsprechen der Ecotin-Signalsequenz. Zwischen Ecotin (Aminosäuren 21–162) und Pepsinogen (Aminosäuren 174–546) wurde ein Peptidlinker aus 6 \times Glycin-Serin eingefügt. Für die Reinigung; an Ni-NTA wurden am C-Terminus 6 Histidinreste eingefügt (Aminosäuren 547–552). Der Pfeil zeigt die Spaltstelle für die Prozessierung von Pepsinogen zu Pepsin.

Fig. 3: SDS-PAGE Analyse bei Expression und Reinigung des Ecotin-Pepsinogen Fusionsproteins

[0039] Der Pfeil links zeigt das Ecotin-Pepsinogen Fusionsprotein (58 kDa). Aufgetragen wurden in Spur 1, Proteingrößenstandard (Peglab); 2, Periplasma-Extrakt; 3–5 Ni-NTA Chromatographie, 6, Überstand nach Dialyse, 7, Aggregat nach Dialyse, 8, HiTrapQ Chromatographie, 9, ein Periplasma-Extrakt nach Aktivierung von Pepsinogen zu Pepsin (Zusatz von 0,1 Vol 1 M Citrat pH 2,0).

Fig. 4: Effekt von Glutathion auf die Reinigung von Ecotin-Pepsinogen aus dem Periplasma

[0040] Dargestellt sind SDS PAGE-Analysen nach Reinigung von Ecotin-Pepsinogen aus dem Periplasma (Beispiel 3). Beide Gele zeigen den letzten Reinigungsschritt, Fraktionen nach Gelfiltration an Superdex G-75. In A wurde dem Periplasma-Extrakt 1mM oxidiertes und reduziertes Glutathion zugesetzt, in B nicht. Der obere Pfeil zeigt das Ecotin-Pepsinogen Fusionsprotein (58 kDa), der untere Pfeil SlyD (20 kDa) aus E. coli, das unter den Bedingungen in B coeluiert.

Fig. 5: Säurekatalysierte Aktivierung des gereinigten Ecotin-Pepsinogen-Fusionsproteins

[0041] Das gereinigte Ecotin-Pepsinogen Fusionsprotein wird nach Zusatz von Säure autokatalytisch zu Pepsinprozessiert (Beispiel 4). Freigesetztes Pepsin spaltet zunächst die Ecotin-Domäne, dann wird auch restliches Pepsinogen vollständig zu Pepsinprozessiert. Spur 1, Proteinstandard (Peglab); Spur 2, Ecotin-Pepsinogen-Fusionsprotein nicht aktiviert; Spuren 3–10, Zusatz von 0,1 Vol. 1 M Citrat pH 2,0: 30s, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min und 16 min. Der obere Pfeil zeigt das Fusionsprotein, der mittlere Pfeil Pepsinogen, der untere Pepsin.

Fig. 6: Humanes Proinsulin

[0042] Gezeigt ist eine Abbildung nach (Mackin et al., 1998). Die beiden intermolekularen Disulfidbrücken der A- und B-Kette und die intramolekulare Disulfidbrücke der A-Kette sind mit Linien gezeigt. Die natürlichen Spaltstellen für die Prozessierung von Proinsulin zu Insulin durch die Proteasen PC1, PC2 und CPE sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Fig. 7: Ecotin-Proinsulin Fusionsprotein

[0043] Die Aminosäuren 1–20 entsprechen der Ecotin-Signalsequenz. Zwischen Ecotin (Aminosäuren 21–162) und Proinsulin (189–273) befindet sich ein Peptidlinker aus 6 \times Glycin-Serin, gefolgt von der Sequenz für eine Thrombin-Spaltstelle für die Spaltung des Fusionsproteins in Ecotin und Proinsulin. Der N-terminus von Proinsulin wurde mit einem Affinitäts-tag aus 6 Histidin-Resten sowie einem Arginin zur Prozessierung durch Trypsin versehen.

Tabelle 1
Reinigung des Ecotin-pepsinogen Fusionsproteins

Schritt	Vol (ml)	Gesamtprotein (mg) ^a	Fusionsprotein (mg) ^c	Ausbeute (%)
Periplasma-Aufschluss	360	612,6	8,9	100,0
Ni-NTA Pool, dialysiert	190	47,0	4,8	54,8
HiTrapQ Chromatographie	9	11,5	4,1	46,8
Sephadex G-75 Chromatographie	22	5,2 ^b	2,0	22,9

^a Das Gesamtprotein wurde nach Bradford bestimmt.

^b Das gereinigte Protein wurde mit A_{280} bestimmt, mit $\epsilon = 83240 \text{ x Mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$ (Ecotin-Pepsinogen Fusion)

^c Natives Fusionsprotein wurde bestimmt über die proteolytische Aktivität, als Referenz diente Pepsinogen aus Schwein (Sigma).

1 mg Pepsin entspricht 1,16 mg Pepsinogen bzw. 1,67 mg Fusionsprotein.

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.
Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

Patentansprüche

1. Fusionsprotein zur Produktion von rekombinanten Proteinen oder Peptiden im Periplasma enthaltend N-terminal die Aminosäuresequenz für die Ecotin-Signalsequenz und für Ecotin sowie C-terminal für das rekombinante Protein oder Peptid.
2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass eine Peptidsequenz zwischen Ecotin und dem rekombinanten Protein oder Peptid generiert wird.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die Peptidsequenz zwischen Ecotin und dem rekombinanten Protein oder Peptid eine Protease-Schnittstelle enthält.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, dass eine inhibitorisch inaktive Ecotin-Variante verwendet werden kann.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, dass eine monomere Ecotin-Variante eingesetzt werden kann.
6. Verfahren zur Herstellung therapeutisch relevanter disulfidverbrückter Proteine oder Peptide gekennzeichnet dadurch, dass die Proteine oder Peptide mittels Fusion an *Escherichia coli* Ecotin und anschließender nativer Expression im Periplasma gewonnen werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6 gekennzeichnet dadurch, dass während der Präparation des Periplasmas niedermolekulare Thiole zugesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6, gekennzeichnet dadurch, dass als Thiol 1mM oxidiertes und reduziertes Gluthation eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 6, gekennzeichnet dadurch, dass als rekombinantes disulfidverbrücktes Protein eine Aspartat-Protease verwendet werden kann.
10. Verfahren nach Anspruch 6, gekennzeichnet dadurch, dass als rekombinantes disulfidverbrücktes Protein humanes Proinsulin eingesetzt werden kann.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

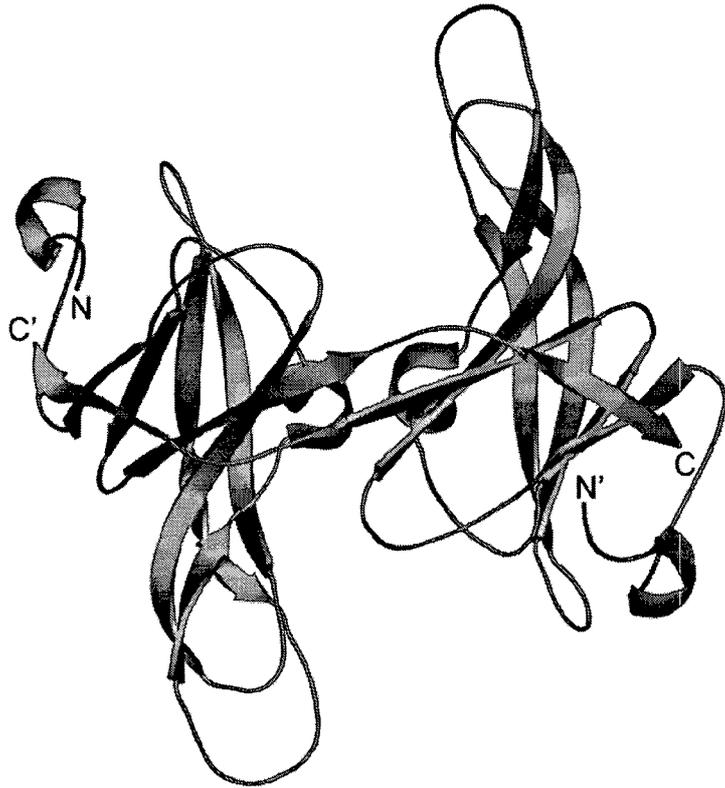


Fig. 1

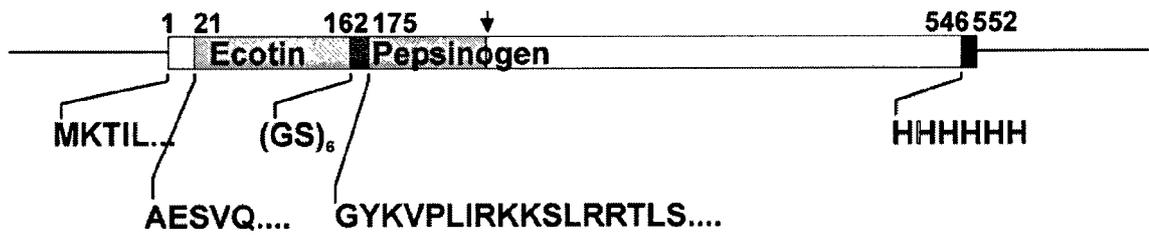


Fig. 2

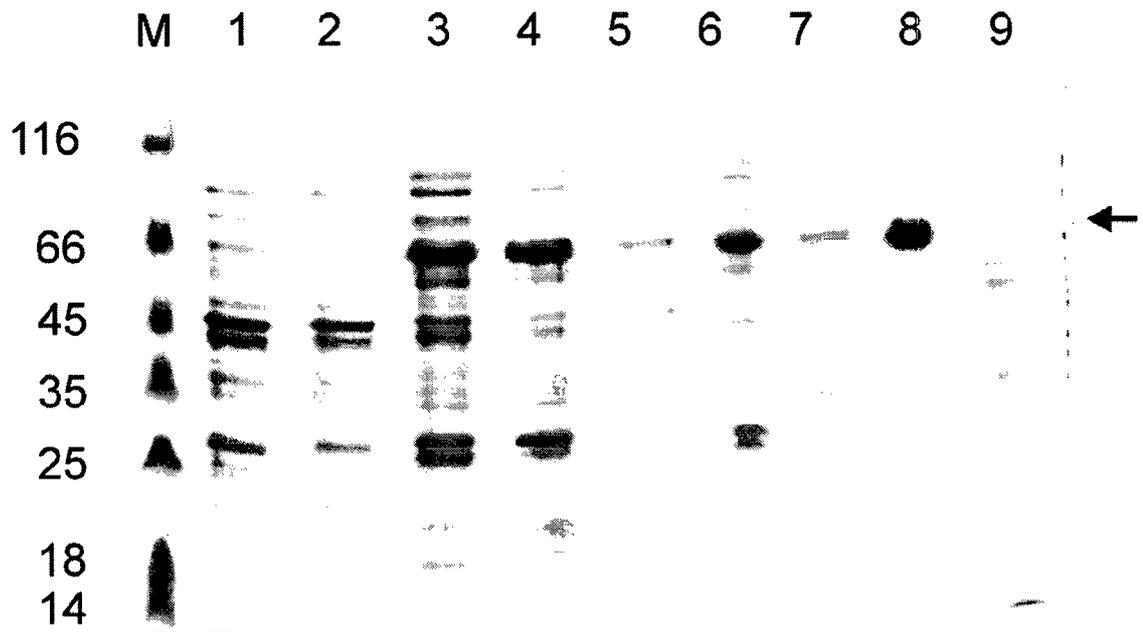


Fig. 3

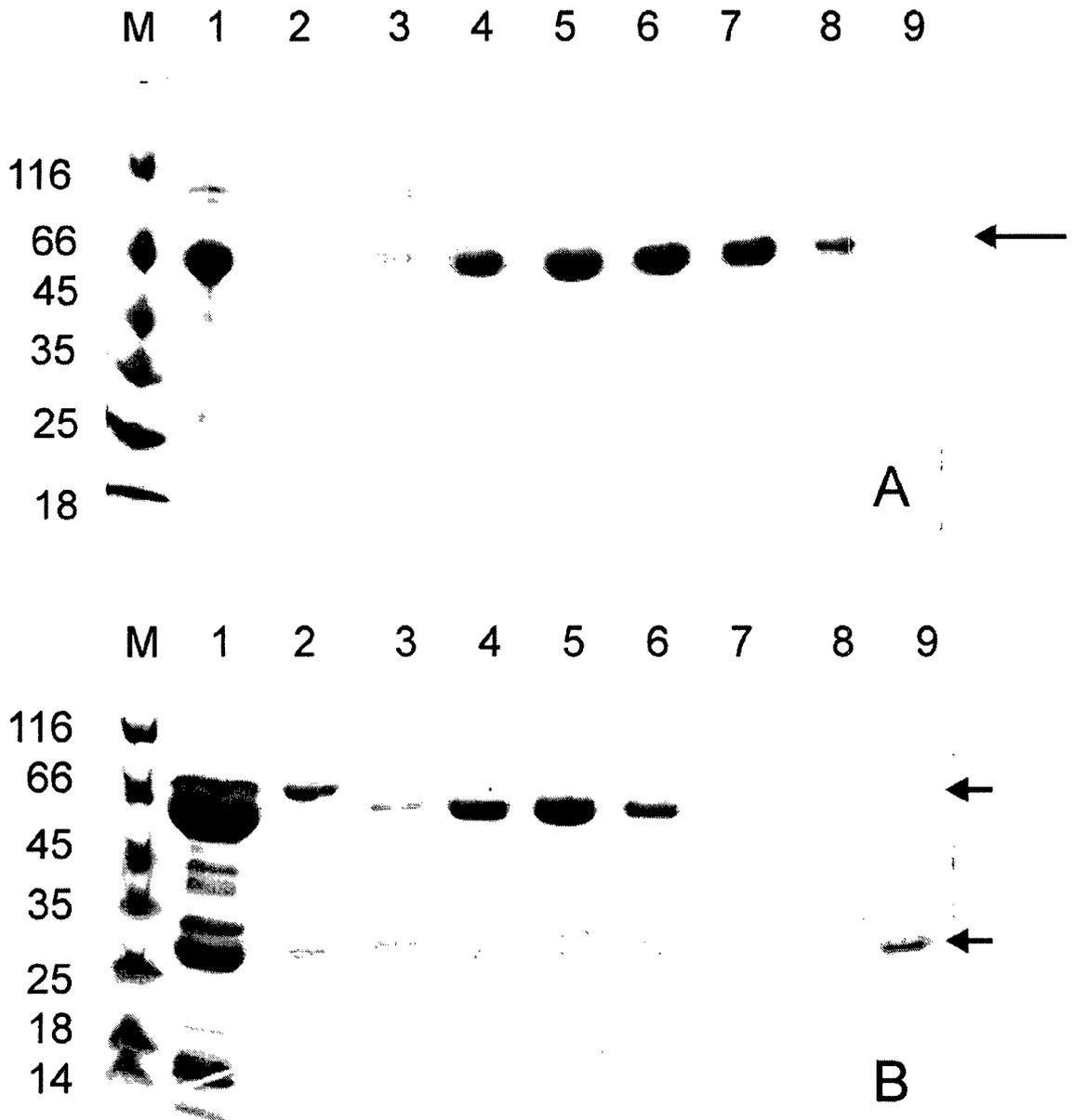


Fig. 4

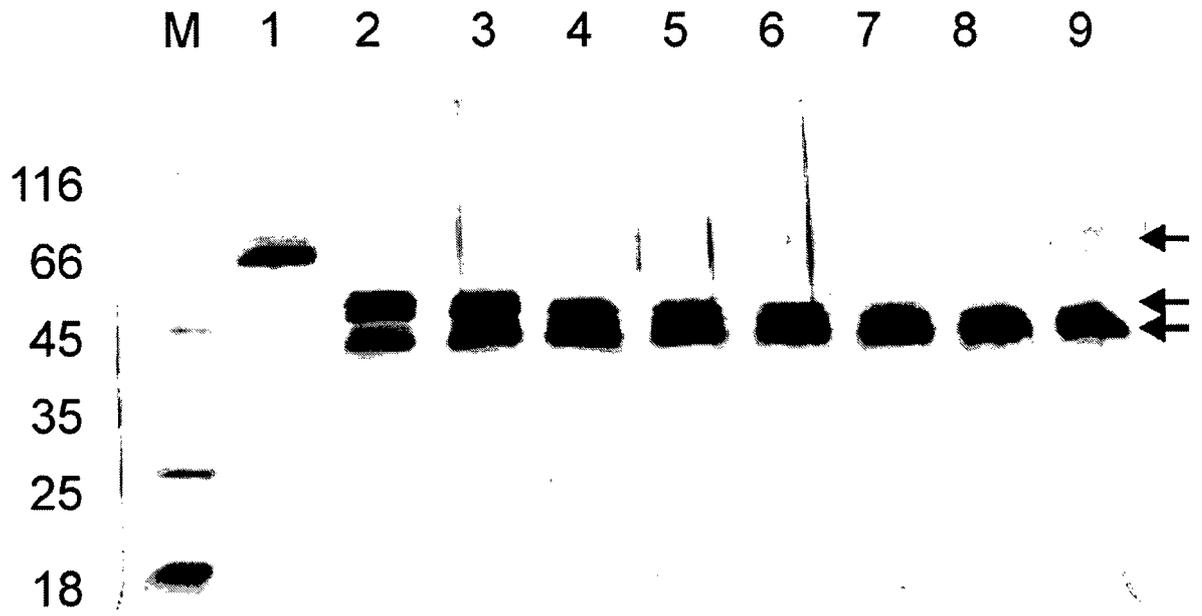


Fig. 5

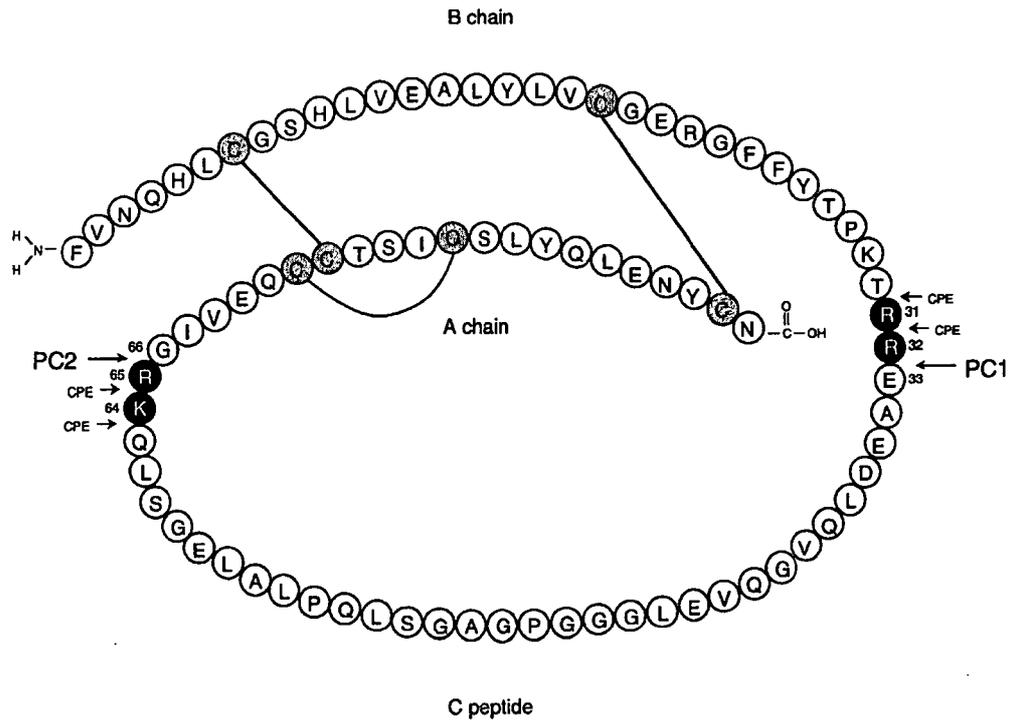


Fig. 6

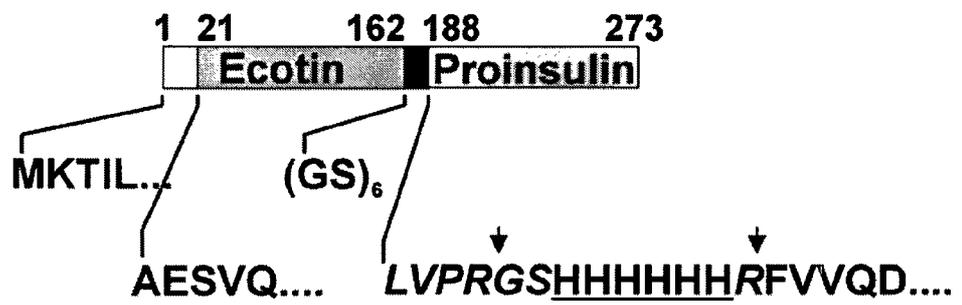


Fig. 7