

Sposób wytwarzania insuliny i jej pochodnych oraz peptyd hybrydowy stosowany w tym sposobie

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania insuliny i jej pochodnych oraz peptyd hybrydowy stosowany w tym sposobie.

Cukrzyca (diabetes mellitus), choroba metaboliczna (grupa chorób metabolicznych) o wieloczynnikowej etiologii, jest jedną z najgroźniejszych chorób społecznych i cywilizacyjnych, nazywana jest też czasem epidemią XXI wieku. Wiążąc się z poważnymi powikłaniami, nieleczona cukrzyca może prowadzić do śmierci pacjenta. Jeżeli przewlekła hiperglikemia wynika z niedostatecznego wydzielania insuliny przez organizm - cukrzyca typu 1 - leczenie wymaga stałego stosowania insuliny i/lub jej analogów. Liczba chorych na cukrzycę wynosi 5-6% populacji, a roczny wzrost liczby diabetyków wynosi ok. 4-6% w zależności od regionu świata. Zachorowalność na tę chorobę wciąż wzrasta; jest uznana za chorobę cywilizacyjną - do rozwoju cukrzycy w dużym stopniu przyczynia się obecny styl życia - z tego też powodu do tej pory nie udaje się zahamować rozwoju tej choroby. Również mimo postępu medycyny, insulina oraz jej analogi szybko działające i długo działające stanowią podstawę leczenia cukrzycy typu 1 (10% całkowitej liczby przypadków choroby). Stosowana w leczeniu cukrzycy w dużych ilościach insulina i jej rozmaite pochodne są wytwarzane w dużej skali przemysłowej i z tej przyczyny metody jej wytwarzania są stale ulepszane w celu podwyższenia wydajności procesu i obniżenia kosztów produkcji. Ekonomia procesu produkcji jest również istotna dla zwiększającej się liczby wytwórców biopodobnych insulin [m. in.: S. Gough, Practical Diabetes 2013, 30 (4), 146-147a, G. Dranitsaris, E. Amir, K. Dorwart, Drugs 2011, 71 (12)1527-1536].

W pierwszym okresie po odkryciu insuliny, jako lek dla ludzi stosowana była insulina zwierzęca, wydzielana z trzustek wołowych lub wieprzowych. Humanizowanie tych insulin przez wymianę różnicujących ich aminokwasów metodą syntetyczną nie

znalazło zastosowania w skali przemysłowej. Dopiero metody biosyntetyczne rozwiązały problem dostępu chorych do insuliny ludzkiej, a pierwszym procesem było biotechnologiczne oddzielne wytworzenie rekombinowanych łańcuchów A i B insuliny ludzkiej, a następnie ich połączenie w hormon taki, jaki jest wytwarzany endogennie w ludzkiej trzustce (D. V. Goeddel et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 76: 106-110, 1979). Od końca ubiegłego stulecia, biosyntetyczna insulina ludzka i jej analogi, wytwarzane przez transformacje jednołańcuchowego białka fuzyjnego, stanowią podstawowe źródło tego hormonu jako egzogenego leku. Jest on wytwarzany w rekombinowanych systemach bakteryjnych, przede wszystkim w komórkach *Escherichia coli* (patent polski nr PL 127 843) lub drożdży (L. Thim et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 6766-6770, 1986). Metoda wytwarzania tych leków jest ogólnie opisana w licznych opisach patentowych oraz publikacjach naukowych i polega na nadekspresji genu kodującego preproinsulinę, czyli polipeptyd hybrydowy, składający się z białka liderowego oraz proinsuliny, tj. łańcucha B insuliny (lub jej pochodnej), peptydu łącznikowego i łańcucha A insuliny (lub jej pochodnej). Po wyizolowaniu białka fuzyjnego, kolejnym etapem wytwarzania jest odcięcie białka liderowego i peptydu łącznikowego, po czym wydziela się czysty hormon. Jednym z przykładów takiego procesu jest sposób wytwarzania insuliny ludzkiej opisany w patencie polskim nr PL 180 818, a metody te są stale udoskonalane (np. polskie opisy patentowe: PL167 810, PL168 114, PL177 002, PL178 466, PL180 968, PL183 284, PL191 901, PL196, 626, PL198 190, PL203 195, PL203 2546, PL210 437 i zgłoszenia patentowe P.309 882, P.310 007, P.320 644, P.356 005, P.374 949, P.385 586 i P.391 975).

Biosyntetyczna insulina ludzka i jej analogi są podstawowymi lekami w terapii cukrzycy typu 1 oraz mają istotne znaczenie w leczeniu typu 2 z problemami innej kontroli poziomu glukozy. Choć leczenie insuliną ludzką od 30 lat przynosi w większości

przypadków zadawalające wyniki, powstały liczne jej analogi pozwalające na lepszą metaboliczną kontrolę cukrzycy dzięki ich szybszemu lub przedłużonemu działaniu. Od kilku już lat sprzedaż analogów insuliny przekracza połowę światowego rynku insulin, jednocześnie ochrona patentowa tych leków zaczyna wygasać. Ta sytuacja pozwala na wejście na rynki medyczne nowych producentów tych insulin jako leków biopodobnych, zgodnie z regulacjami Unii Europejskiej i USA. Z tych powodów istotne stają się wydajne metody ich biosyntezy, zapewniające wysoką ekspresję pożądaných białek.

W patencie polskim nr PL180 818 opisano wydajny sposób wytwarzania rekombinowanej insuliny ludzkiej przy użyciu szczepu bakterii *E. coli* pozbawionego represora *cytR* (opisanego w europejskim zgłoszeniu patentowym nr EP.0303972) transformowanego plazmidem z operonem *deo*, zawierającym region kodujący białko hybrydowe (prekursor) obejmujące peptyd liderowy, o długości 62 aminokwasów pochodzący z N-końca modyfikowanej ludzkiej dysmutazy nadtlenkowej (CuZnSOD) poprzedzony od końca N aminokwasem Met i zakończony od końca C resztą Arg łączącą go z łańcuchem B insuliny. Łańcuch B insuliny połączony jest z łańcuchem A krótkim peptydem łącznikowym składającym się ze znanych łączników Lys-Arg (europejski opis patentowy nr EP195 691) lub Arg (europejski opis patentowy nr EP347 781).

Celem wynalazku było uzyskanie wydajnego sposobu otrzymywania insuliny i jej analogów o kilkanaście procent przewyższającego wydajność procesu z zastosowaniem peptydu C jako białka łącznikowego, a także białek hybrydowych znajdujących zastosowanie w tym sposobie -

Przedmiotem wynalazku jest polipeptyd posiadający sekwencję aminokwasową o wzorze ogólnym:

X_n -B-Arg-Arg-A

gdzie:

A oznacza polipeptyd łańcucha A insuliny lub jej analogu, korzystnie o sekwencji wybranej spośród Sekw. Nr Id.: 1-4,

B oznacza polipeptyd łańcucha B insuliny lub jej analogu, korzystnie o sekwencji wybranej spośród Sekw. Nr Id.: 5-7,

n oznacza 0 lub 1,

X oznacza polipeptyd białka liderowego, korzystnie o sekwencji wybranej spośród SOD o Sekw. Nr Id.:8 lub UBI o Sekw. Nr Id.:9.

Korzystnie polipeptyd według wynalazku posiada sekwencję aminokwasową wybraną spośród: Sekw. Nr Id.: 10-27.

Polipeptyd według wynalazku jest przeznaczony do wytwarzania insuliny ludzkiej poprzez ekspresję tego polipeptydu w komórce szczepu bakterii *Escherichia coli* pozbawionej represorów *deo* i/lub genu *deo (cytR)* zawierającej DNA kodujący ten polipeptyd, przy czym ten DNA jest obecny w wektorze pod kontrolą promotora *deoP₁P₂* natomiast polipeptyd hybrydowy zawiera łańcuch B insuliny kowalencyjnie związany z łańcuchem A dipeptydem Arg-Arg.

Zatem, kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania insuliny ludzkiej obejmujący mikrobiologiczną ekspresję rekombinowanego białka zawierającego insulinę charakteryzujący się tym, że obejmuje:

(a) otrzymywanie polipeptydu hybrydowego zawierającego proinsulinę poprzez ekspresję tego polipeptydu hybrydowego w komórce szczepu bakterii *Escherichia coli* pozbawionej represorów *deo* i/lub genu *deo (cytR)* zawierającej DNA kodujący polipeptyd hybrydowy, przy czym ten DNA jest obecny w wektorze pod kontrolą promotora *deoP₁P₂* natomiast polipeptyd hybrydowy zawiera łańcuch B insuliny kowalencyjnie związany z łańcuchem A dipeptydem Arg-Arg

(b) odzyskiwanie polipeptydu hybrydowego,

(c) ufałdowywanie i tworzenie wiązań dwusiarczkowych w polipeptydzie hybrydowym otrzymanym w (b), unikając uprzedniego poddawania polipeptydu hybrydowego siarczynolizie,

(d) poddawanie uzyskanego w (c) ufałdowanego, z utworzonymi wiązaniami dwusiarczkowymi polipeptydu hybrydowego trawieniu enzymatycznemu w celu otrzymania insuliny,

(e) oczyszczania tak wytworzonej insuliny.

Jako łańcuch A insuliny ludzkiej oraz łańcuch B insuliny ludzkiej zgodnie z wynalazkiem należy rozumieć zarówno polipeptyd posiadający zarówno sekwencję aminokwasowa występującą w naturze jak i sekwencję jej znanego analogu.

Korzystnie, peptydem hybrydowym jest peptyd według wynalazku określony powyżej.

Korzystnie, w etapie (a) ekspresję prowadzi się w szczepie *E.coli* o genotypie $F^{-}ara \Delta(pro lac) rpsL thi cyt R rec A \lambda^{-}$, pozbawionym aktywnego białka represora *cyt R*.

Korzystnie, w etapie (a) jako wektor stosuje się plazmid *pIBA* o sekwencji Sekw Nr Id: 28.

Korzystnie, etap (a) obejmuje fermentację w obecności glukozy, glicerolu lub galaktozy.

Korzystnie, etap (b) obejmuje:

(i) niszczenie ściany komórkowej komórki bakteryjnej lub jej fragmentów w celu utworzenia lizatu, korzystnie poprzez działanie lizozymu i Tritonu X100 a następnie sonifikację lub dezintegrację;

(ii) izolowanie wewnątrzkomórkowego precypitatu ciałek inkluzyjnych z lizatu przez wirowanie; i

(iii) rozpuszczanie precypitatu ciałek inkluzyjnych.

Korzystnie, etap (c) obejmuje inkubację polipeptydu hybrydowego, korzystnie w obecności kwasu askorbinowego, zwłaszcza w stężeniu około 2 moli na mol grup SH obecnych w mieszaninie, w temperaturze od 4 do 37°C przez około od 1 do 30 godzin, korzystnie około 5 godzin, w pH od 8,5 do 12, korzystnie w pH od 11,0 do 11,25.

Korzystnie, etap (d) obejmuje ponadto:

(i) doprowadzanie pH do około 8,8-9,0; i

(ii) trawienie polipeptydu hybrydowego trypsyną oraz

ewentualnie proteazą deubikwitynująca, np. UBP1ΔC lub UBP1ΔC2, i następnie ewentualnie karboksypeptydazą B w temperaturze 16-37°C w ciągu 30 minut do 16 godzin.

Korzystnie, etap (e) obejmuje ponadto oczyszczanie roztworu przez niskociśnieniową chromatografią cieczową na Sefarozie Q przed trawieniem trypsyna.

Korzystnie, etap (e) obejmuje ponadto oczyszczanie roztworu niskociśnieniową chromatografią na DEAE-Sepharose przed trawieniem karboksypeptydazą B.

Korzystnie, etap (e) obejmuje ponadto oczyszczanie uzyskanej insuliny wysokosprawną chromatografią cieczową, korzystnie do czystości co najmniej 98%, a następnie krystalizację, filtrację i suszenie.

Korzystnie, w etapie (e) oczyszczaną insuliną jest białko wybrane z grupy do której należy: insulina ludzka, insulina ludzka Lys^{B28}Pro^{B29} (insulina lispro), insulina Gly^{A22}Arg^{B31} (insulina GR), insulina ludzka Ser^{A22}Arg^{B31} (insulina SR), insulina Ser^{A22}Lys^{B3}Arg^{B31} (insulina SK3R), proinsulina B-ArgArg-A:dezAsn^{A21}Gly^{A21}.

Szczegółowy opis wynalazku.

W ramach poszukiwań wysokosprawnych systemów ekspresji insulin, zaplanowano badania nad wpływem rodzaju peptydu łącznikowego łączącego łańcuchy A i B (proinsuliny) na wydajność insuliny i jej analogów w systemie genowym opisanym w patencie polskim nr PL 180 818.

Zgodnie z wynalazkiem jako rekombinowaną preproinsulinę przyjmuje się połączenie proinsuliny z dodatkowym polipeptydem liderowym, np. ubikwityną albo dysmutazą ponadtlenkową (SOD), albo ich fragmentami. W świetle uznanej terminologii, przez rekombinowaną proinsulinę rozumie się łańcuch polipeptydowy, w którym łańcuchy A i B insuliny ludzkiej lub jej analogu są połączone dowolnym (poli)peptydem (łącznikowym) umożliwiającym ich ufałdowanie poprzez utworzenie 2 połączeń disiarczkowych między łańcuchami A i B oraz trzeciego - w obrębie łańcucha A.

Zgodnie z wynalazkiem, przez insulinę rozumie się rekombinowaną insulinę ludzką lub jej rekombinowany analog o działaniu hipoglikemizującym.

Zgodnie z wynikami przeprowadzonych badań, według wynalazku specjalnie wydajny sposób wytwarzania insuliny i jej analogów obejmujący mikrobiologiczną nadekspresję genu kodującego rekombinowany polipeptyd hybrydowy, zawierający proinsulinę, w komórkach szczepów bakterii *Escherichia coli* pozbawionych represora *cytR* transformowanego odpowiednim wektorem z wstawionym właściwym genem pod kontrolą promotora *deoP1P2*, polega na tym, że wytwarzana proinsulina składa się z łańcucha B insuliny kowalencyjnie związanego z łańcuchem A dipeptydem Arg-Arg jako peptydem łącznikowym. W celu przeprowadzenia badań, na podstawie opisu patentu nr PL 180 818 wytworzono plazmid *pIBA*, zawierający region kodujący promotor *deoP1P2* oraz fragment genu ludzkiej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, 62 aa) lub ubikwityny (UBI) opisany w patentach US 8158382 oraz US 8956848 oraz przez A. Wójtowicz i in., *Microbial Cell Fact.* 2005, 4: 17 i *Microb Cell Fact.* 2014; 13(1): 113. W tej samej ramce odczytu znajduje się następnie fragment kodujący odpowiednią proinsulinę - ewentualnie modyfikowany łańcuch B, peptyd łącznikowy i ewentualnie modyfikowany łańcuch A. Elementy regulacyjne plazmidu pochodzą z wektora pBR322 (ATCC 31344). Promotor *deoP1P2* pochodzi z bakteryjnego operonu *deo* złożonego z czterech ściśle powiązanych genów regulujących katabolizm nukleotydów i dezoksynukleotydów w bakteriach *Escherichia coli*; jego sekwencję zamplifikowano z chromosomalnego DNA szczepu *E. coli* K12 w oparciu o sekwencję nukleotydową z bazy danych genów [GenBank: AP009048]. W oparciu o szczep bakterii *E. coli* CSH50 (ATCC:39111; Cheng i wsp., *Gene*; 14 Suppl. 1-2: 121-130, 1981), otrzymano szczep *E. coli* IBA, o genotypie $F^- ara \Delta (pro lac) rpsL thi cyt R rec A \lambda^-$, pozbawiony aktywnego białka represora *cyt R* poprzez wprowadzenie mutacji do jego genu, stosując metodę opisaną w

europiejskim zgłoszeniu patentowym nr PL 0303972. Po transformacji szczepu gospodarza *E. coli* IBA plazmidem *pIBA* uzyskano opisany w patencie polskim 180 818 system ekspresji kodowanego białka fuzyjnego w wektorze *pIBAINS* pod kontrola promotora *deoP1P2*, który jest ujemnie kontrolowany przez białko chromosomalnego represora, produktu genu *cytR* (K. Hammer-Jespersen i inni, *Molec. Genet.* 1975;137:327-335). W konstrukcji plazmidów zastosowano elementy-fragmety DNA kodujące różne białka liderowe i różne pochodne insuliny, przy czym łańcuch A (pro)insuliny był połączony z łańcuchem B insuliny różnymi peptydami łącznikowymi - których przykłady podano poniżej.

Wydajność wytwarzania insuliny i jej analogów w tym systemie ekspresji i z różnymi peptydami łącznikowymi porównano z ekspresją tych hormonów z użyciem innych szczepów *E. coli* i wektora będącego pochodną plazmidu *pIGAL* (Bank genów AY 424310), badając przede wszystkim zależność wydajności od rodzaju peptydu łącznikowego.

Zastosowanymi peptydami łącznikowymi były sekwencje:

1. Lys-Arg
2. Arg
3. Arg-Arg
4. Peptyd C

Według wynalazku przebadaną insuliną i jej pochodnymi-analogami były:

rekombinowana insulina ludzka (opis patentu polskiego nr PL128 599),

insulina ludzka Lys^{B28}Pro^{B29} (insulina lispro, opis patentu polskiego nr PL180 968),

insulina ludzka Gly^{A22}Arg^{B31}; (opis patentu polskiego nr PL219335 lub US 08618048, insulina GR),

insulina ludzka Ser^{A22}Arg^{B31} (opis polskiego zgłoszenia patentowego nr P.219335, insulina SR),

insulina ludzka Ser^{A22}Lys^{B3}Arg^{B31} (opis polskiego zgłoszenia patentowego nr P.399287, insulina SK3R) oraz preproinsulina (prekursor) G: białko liderowe - łańcuch B - łącznik - łańcuch A:dezAsnA21GlyA21.

Jako szczep gospodarza *E. coli* do badań wydajności wykorzystano *E. coli* IBA; istotą jego właściwości jest nieaktywny gen białka represyjnego *cytR*, co ujawniono i opisano w literaturze fachowej (m. in. Miller J H. Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1972), czy w opisie patentu USA 4 480 038 lub patentu polskiego 180 818 dla szczepów *E. coli* zdeponowanych pod numerami dostępu ATCC 69361 i 69363. Dla celów porównawczych stosowano również inne, szeroko stosowane w badaniach szczepy - *E. coli* DH5, *E. coli* DH5alfa i *E. coli* HB101.

Jako plazmidy do ekspresji białek do badań wydajności wykorzystano wektor pIBA - promotor *deoP1P2*, oporność: tetracyklina, terminator transkrypcji *terA* Trp, ale dla celów porównawczych stosowano również inne wektory - pochodną pIGAL1 (Bank genów AY 424310) - promotor *pms*, oporność: ampicylina, terminator transkrypcji ST1; pochodną pIGAL1 - promotor *pms*, oporność: tetracyklina, terminator transkrypcji *terA* Trp i pochodną pIGAL1 - promotor *deoP1P2*, oporność: tetracyklina, terminator transkrypcji ST1. Jako białko liderowe do badań wydajności stosowano przede wszystkim modyfikowany fragment SOD, jak w opisie patentu polskiego nr PL 180 818 oraz modyfikowaną ubikwitynę (UBI), opisaną w opisie patentowym US 8158382 oraz US 8956848. W dalszej części niniejszego opisu terminy SOD i UBI oznaczają związki opisane odpowiednio w tych opisach patentowych. Sposób wytwarzania każdej insuliny, będącej przedmiotem niniejszego zgłoszenia, realizuje się klasyczną metodą inżynierii genetycznej i biotechnologii. Polega ona na tym, że konstruuje się odpowiedni szczep, który w procesie biosyntezy (fermentacji) wytwarza żądany polipeptyd

hybrydowy (odpowiednią preproinsulinę), która następnie transformuje się w żądany produkt, oczyszcza się i izoluje. System ten jest uniwersalny dla wytworzenia rekombinowanej insuliny ludzkiej i jej badanych – niewiele różniących się – analogów. Dla tego celu skonstruowane zostały modyfikacje genu rekombinowanej preproinsuliny ludzkiej przy wykorzystaniu technik genetycznych takich jak np. reakcja miejscowo – specyficznej mutagenyzy. Reakcję mutagenyzy punktowej przeprowadzono przy użyciu zestawu firmy Stratagene (nr kat. 200518-5); jako matrycę wykorzystano DNA plazmidowe plazmidu pIBA oraz pIGAL. Jako matrycę można również wykorzystywać dowolny inny DNA zawierający odpowiednią sekwencję kodującą rekombinowaną ludzką proinsulinę lub preproinsulinę.

Dla każdej insuliny wytworzono konstrukty plazmidowe – wektory – kodujące badaną (pre)proinsulinę z (poli)peptydem łącznikowym, przy czym w konstrukcji plazmidów zastosowano elementy-fragmenty DNA kodujące różne proinsuliny – składające się z różnych peptydów łącznikowych i różnych pochodnych insuliny.

Wektorami tymi transformowano komórki kompetentne odpowiedniego szczepu *Escherichia coli*, jak np. IBA, DH5 α , DH5, czy HB101, przy czym możliwe jest wykorzystanie komórek innych szczepów *E. coli* lub komórek innych mikroorganizmów albo innych znanych linii komórkowych nadających się do ekspresji białek rekombinowanych. Plazmid zawierający określoną modyfikację genu rekombinowanej preproinsuliny ludzkiej izolowano i sekwencjonowano w celu sprawdzenia poprawności transformacji i sekwencji nukleotydowej. Pojedyncze klony transformowanych szczepów hodowano standardowo na odpowiednim podłożu z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego, przygotowując materiał bakteryjny do badawczego banku szczepów, a próby w stosunku 1:1 hodowli bakteryjnej i 40% glicerolu zdeponowano w temp. -70°C . Wszystkie otrzymane szczepy banków badawczych poddano wyczerpującym badaniom

mikrobiologicznym, biochemicznym i fizykochemicznym, które potwierdziły ich stabilność i zgodność ich właściwości z wymaganiami właściwymi dla banków przemysłowych. Przebieg dalszej biosyntezy oparto na opisie patentu polskiego nr PL 180 818. Po biosyntezie, wytwarzane w szczepach *E. coli* warianty rekombinowanej preproinsuliny izolowano po rozbiciu komórek w postaci ciałek inkluzyjnych, które oddzielano. Z ciałek inkluzyjnych izolowano polipeptyd hybrydowy z insulina lub jej analogiem (odpowiednią preproinsulinę), a następnie poddawano go ufałdowaniu (foldingowi, renaturacji). Uzyskany roztwór ufałdowanego białka hybrydowego poddawano kontrolowanemu działaniu trypsyny, analogicznie jak w przypadku szeregu metod znanych uprzednio i opisanych (np. przez Kemmlera i wsp. w *J. Biol. Chem.*, Vol. 246, str. 6786-6791 (1971) lub w patentach US 6686177, lub US 6100376), albo proteazy deubikwitynującej, jak opisano w patentach US 8158382 oraz US 8956848 oraz przez A. Wójtowicz i in., *Microbial Cell Fact.* 2005, 4: 17 i *Microb Cell Fact.* 2014; 13(1): 113, albo obu tych enzymów. W części przypadków (insulina ludzka, insulina Lispro) działaniem karboksypeptydazy B usuwano dodatkowe aminokwasy peptydu łącznikowego; w pozostałych przypadkach etap ten pomijano. Otrzymaną insulinę i jej analogi poddawano procesowi oczyszczania przy zastosowaniu znanych metod, przede wszystkim chromatografii niskociśnieniowej, ultrafiltracji i HPLC. Z oczyszczonego w dostatecznym stopniu - do wymagań farmakopealnych - roztworu insuliny lub jej analogu, produkt krystalizowano i suszono.

W celu porównania wydajności ekspresji dla każdego gospodarza i wariantu systemu opracowano i zoptymalizowano biosyntezę, izolację i oczyszczanie produktu każdego ze szczepów. Biosyntezę szczepów *Escherichia coli* pozbawionych represora *cytR* transformowanego odpowiednim wektorem z wstawionym właściwym genem pod kontrolą promotora *deoP1P2* prowadzono zgodnie z opisem polskiego patentu nr PL 180 818, w

fermentorach o pojemności 7,5 dm³, stosując ok. 3-5% materiału szczepiennego i minimalną, przemysłową pożywkę do inokulum i hodowli produkcyjnej oraz regulując indukcję żądanego produktu za pomocą glukozy, zgodnie z przykładem 2 polskiego patentu nr PL 180 818. Biosyntezę innych szczepów *E. coli* prowadzono zgodnie z ogólnymi sposobami ich hodowli. Hodowlę inokulum prowadzono przez ok. 10 godzin, do czasu zakończenia logarytmicznej fazy wzrostu bakterii, a hodowlę produkcyjną przez ok. 16 godzin. Dalszy proces wydzielania, transformacji i oczyszczania produktu prowadzono również zgodnie z opisem polskiego patentu nr PL 180 818 - zoptymalizowanym przykładem 2 i 3. W szczególności, po zakończonej biosyntezie produkcyjnej wytworzona brzeczkę chłodzono do ok. 10⁰C, odwirowywano komórki *E. coli*, poddawano je działaniu lizozymu i Tritonu X100, a następnie w temperaturze 5-10⁰C poddawano sonifikacji ultradźwiękami lub dezintegracji ciśnieniowej. Ciała inkluzyjne ponownie odwirowywano, przemywano, po czym poddawano renaturacji, jak ogólnie opisano w przykładzie 3A patentu PL 180 818. Za wyjątkiem białka otrzymywanego według Przykładu 6, dalszy zoptymalizowany proces polegał na poddaniu roztworu niskociśnieniowej chromatografii cieczowej z użyciem DEAE Sepharozy po cytrakonylacji i trawieniu trypsyną lub proteazą deubikwitynującą i trypsyną. Po decytrakonylacji i strąceniu oraz rozpuszczeniu białka, roztwór poddawano kolejnej niskociśnieniowej chromatografii cieczowej z zastosowaniem złoża Sepharozy Q, po której następowało ewentualne trawienie peptydu łącznikowego karboksypeptydazą B. Po końcowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej na złożu Kromasil C8-18, oczyszczony do czystości minimum 98% produkt poddawano krystalizacji, filtracji i suszeniu. Szczegółowy opis całego procesu, całkowicie porównywalnego dla określonych insulin, podano w przykładach. Proces prowadzono w skali pilotowej, stosując metody i aparaturę wykorzystywane w przemyśle. Po zoptymalizowaniu procesu, dla celów badania

wydajności procesu przeprowadzono trzy kolejne szarże każdej insuliny, a przedstawione wyniki są średnią z każdej z nich.

Do porównania wydajności ekspresji, przy ustalonym procesie produkcyjnym, z ujednocnionej kontroli procesowej wybrano badania analityczne pięciu operacji:

(1) Gęstości optycznej (OD_{600}) zakończonej hodowli produkcyjnej;

(2) Masy hodowli (wyizolowanych bakterii) - wyrażanej w g w przeliczeniu na 1 dm^3 hodowli produkcyjnej (wilgotnej i/lub suchej);

(3) Masy wyizolowanych ciał inkluzyjnych, wyrażanej w g na 1 dm^3 hodowli produkcyjnej (wilgotnej i/lub suchej albo jako suchej masy zawiesiny w buforze);

(4) Białka całkowitego (po foldingu prekursora), oznaczanego metodą spektrofotometryczną i wyrażanego w AU/dm^3 lub HPLC i wyrażanego w % ufałdowanego prekursora w białku całkowitym;

(5) Masę oczyszczonego końcowego produktu wyrażaną w mg na 1 dm^3 hodowli produkcyjnej.

W przypadku insuliny lispro podano wyniki badań analitycznych większości etapów - białka całkowitego oznaczanego metodą spektrofotometryczną i wyrażanego w AU/dm^3 i metodą Bradforda i wyrażanego w g na 1 dm^3 hodowli produkcyjnej.

Ogólny schemat blokowy wytwarzania insuliny i jej pochodnych przedstawiono na schemacie 1.

Wynalazek ujawnia, że wydajność końcowa biosyntetycznej insuliny ludzkiej i jej analogów, przy zoptymalizowanym procesie technologicznym biosyntezy, wydzielania, transformacji i oczyszczania, zależąca od stopnia nadekspresji genu kodującego preproinsulinę w komórkach modyfikowanych bakterii *Escherichia coli* (z nieaktywnymi represorami cytr negatywnie regulującymi operon *deo*) transformowanych określonym plazmidem (z promotorem *deoP1P2*), nieoczekiwanie zależy przede wszystkim od zastosowanego łącznika peptydowego, łączącego łańcuch A i B insuliny.

Zgodnie z wynalazkiem nieoczekiwanie ustalono, iż największa wydajność w tym systemie uzyskuje się w przypadku, gdy rolę łącznika peptydowego pełni dipeptyd Arg-Arg.

Dzięki wynalazkowi podano specyficzne warunki dla wytwarzania insuliny ludzkiej oraz jej analogów metodą inżynierii genetycznej, przy zastosowaniu mikrobiologicznej nadekspresji odpowiedniej preproinsuliny w komórkach szczepów bakterii *Escherichia coli* pozbawionych represorów *deo* i/lub genu *deo*, zawierających plazmid DNA kodujący odpowiedni polipeptyd hybrydowy w wektorze pod kontrolą promotora *deoP1P2* z optymalną wydajnością - znacząco podwyższoną w porównaniu z opublikowanymi danymi.

W opisanych poniżej przykładach realizacji wynalazku strukturę, wydajność i czystość wszystkich produktów wyznaczano rutynowo znanymi metodami HPLC i spektrofotometrii UV; do pełnego scharakteryzowania wytworzonych insulin zastosowano również liczne nowoczesne metody i techniki analityczne, między innymi MS, CIEF, LC-MS/MS, GC, mapowanie peptydowe, NMR, krystalografię i proszkową dyfrakcję rentgenowską, CD, FTIR, ELISA czy PCR oraz sekwencjonowanie aminokwasów i nukleotydów.

Dla lepszego wyjaśnienia istoty wynalazku niniejszy opis został uzupełniony o szczegółowe omówienie jego przykładowych realizacji, obejmujące również rysunki, przedstawiające ogólną strukturę (Fig. 1) i sekwencję (Fig. 2) plazmidu *pIBA* zarówno gotowego do insercji genu białka hybrydowego jak i przykładowej realizacji w postaci plazmidu zawierającego gen kodujący białko hybrydowe insuliny (Fig. 3 i Fig. 4).

W przykładach nie podano szczegółowych opisów konwencjonalnych metod bioinżynierii zastosowanych do konstrukcji określonych genów, plazmidów, wektorów ze wstawionymi genami kodującymi badane preproinsuliny czy też sposobów transformacji szczepów bakteryjnych tymi wektorami, jak również metod badania stabilności tych szczepów. Metody te są powszechnie znane

specjalistom w tej dziedzinie i stosowane w laboratoriach biotechnologicznych oraz opisane w licznych publikacjach, z których kluczowe podano w niniejszym opisie. Produkty końcowe wytwarzane metodą według wynalazku są znanymi insulinami, większość szczegółowych bioinżynierskich metod konstrukcji tych rekombinowanych szczepów bakteryjnych opisano w polskim opisie patentowym nr PL 180 968, P. 385 586 i P. 399 287.

Nie opisano również szczegółowo standardowych metod analitycznych stosowanych do określania zawartości i stężenia białek i insulin na poszczególnych etapach wytwarzania, gdyż metody te są również dobrze znane odpowiednim specjalistom i rutynowo stosowane w oznaczaniu białek.

Podane przykłady, nie ograniczając zakresu wynalazku, opisują szczegółowo zastosowaną metodykę badawczą, pozwalającą w pełni kontrolowanym sposobem na dokonanie porównania uzyskanych reprezentatywnych wyników badań zależności wydajności procesu od struktury peptydu łącznikowego.

Przykłady

I. Ogólna procedura prowadzenia procesu

Etap 1. Bank badawczy – hodowla podstawowa

Hodowle podstawowe szczepu *E. coli* IBA, DH5 DH5alfa i HB101 zawierające jako plazmidy do ekspresji białek wektor pIBA i pochodną pIGAL1 (Bank genów AY 424310) prowadzono zgodnie z wymaganiami (ICH Topic Q 5 D: Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products oraz ICH Topic Q 5 B: Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cell Lines Used for Production of r-DNA Derived Protein Products) na podłożu podstawowym:

Podłoże podstawowe:

- | | |
|----------------------|-------|
| - Hydrolizat kazeiny | 20 g |
| - Ekstrakt drożdżowy | 10 g |
| - NaCl | 5,0 g |

- Woda do objętości 1 dm³
- Antybiotyk (tetracyklina lub ampicylina) do końcowego stężenia 12,5 µg/cm³ TET lub 100 µg/cm³ Amp

Kolbę z podłożem podstawowym z antybiotykiem szczepiono pojedynczą kolonią bakteryjną uzyskaną po transformacji i wytrząsano (220 obr./min.) w 37°C do gęstości optycznej OD₆₀₀ ok. 1.

Otrzymaną hodowlę mieszano z podłożem do zamrażania (1:1) i zamrażano w temperaturze -70°C w porcjach po 1 ml.

Podłoże do zamrażania:

- K₂HPO₄ 6,3 g
- KH₂PO₄ 1,8 g
- Cytrynian sodu x 2H₂O 0,57 g
- MgSO₄ x 7H₂O 0,09 g
- (NH₄)₂SO₄ 0,9 g
- Glicerol 44,0 g
- Woda do objętości 450 cm³

Dla uzyskanej hodowli bakteryjnej wykonywano następujące badania:

- pomiar gęstości optycznej hodowli OD przy długości fali 600 nm;
- sprawdzenie jednorodności hodowli bakteryjnej wykonując preparat przyżyciowy. Oceniano czystość hodowli bakteryjnej, cechy morfologiczne - wygląd, kształt komórek. Obserwacja preparatu w mikroskopie Olympus CX 40;
- wyznaczano najbardziej prawdopodobną liczbę jednostek tworzących kolonie na podłożu TSA i TSA z konkretnym antybiotykiem - cfu/ml;
- sprawdzano czystość mikrobiologiczną hodowli na podłożach Sabouraud (do identyfikacji zanieczyszczeń grzybami) i TSA (do identyfikacji zanieczyszczeń innymi bakteriami).

Etap 2. Inokulum

Inokulum przygotowuje się w kolbach o pojemności 250-300 ml i wypełnieniu 50 ml pożywki do inokulum. Do każdej z kolb dodawane są sterylnie roztwory:

- Antybiotyk (tetracyklina lub ampicylina, 12,5 mg/ml) 50 μ l
- Glukoza 50 % 500 μ l

Do hodowli szczepów *E. coli* IBA dodaje się dodatkowo:

- Prolina (100 mg/ml) 300 μ l
- Tiamina (50 mg/ml) 2-5 μ l.

Po zaszczepieniu kolb hodowlą podstawową (bank roboczy), inokulum inkubuje się w temperaturze 30-37°C przez 16-18 godzin do osiągnięcia OD₆₀₀ ok. 0,7-1,0 na wytrząsarce przy 180-200 rpm.

Pożywka do inokulum (skład na 1 dm³):

- K₂HPO₄ 9 g
- KH₂PO₄ 1 g
- NaCl 5 g
- NH₄Cl 1 g
- MgSO₄·7H₂O 0,4 g
- Cytrynian żelazowo-amonowy 0,01 g
- Ekstrakt drożdżowy 0,2 g
- Roztwór pierwiastków śladowych 1 ml
- MnSO₄ x H₂O 1 g/dm³
- ZnSO₄ x 7 H₂O 2,78
- CoCl₂ x 7 H₂O 2 g/dm³
- Na₂MoO₄ x 2 H₂O 2 g/dm³
- CaCl₂ x 2 H₂O 3 g/dm³
- CuSO₄ x 5 H₂O 1,85 g/dm³
- H₃BO₄ 0,5 g/dm³
- HCl (32%) 100 ml/dm³

Etap 3. Hodowla produkcyjna (Fermentor BioFlo 310 firmy NewBrunswick 7,5 dm³ (objętość startowa 4 dm³))

Parametry wyjściowe hodowli:

- Temperatura: 37 °C
- pH: 7,1±0,01
- DO: 30-35%
- Obroty: 250 rpm
- Przepływ powietrza: 5 dm³/min.

Do sterylne go fermentora z 4 dm³ pożywki produkcyjnej i antypieniaczem Antifoam 204 (0,5-1 ml, SIGMA) dodaje się sterylnie roztwory:

- 6 g MgSO₄ x 7H₂O w 80 cm³ wody
- 0,2 g CaCl₂ x 2H₂O w 60 cm³ wody
- glukoza 50%, 4 cm³

Do hodowli szczepów *E. coli* IBA dodaje się dodatkowo:

- Prolina (100 mg/ml) 24 cm³
- Tiamina (50 mg/ml) 200-500 µl.

Pożywka produkcyjna:

- | | |
|---|------------------------|
| ○ K ₂ HPO ₄ - | 8 g/dm ³ |
| ○ KH ₂ PO ₄ - | 2 g/dm ³ |
| ○ NH ₄ Cl - | 3 g/dm ³ |
| ○ Cytrynian żelazowo-amonowy - | 0,15 g/dm ³ |
| ○ K ₂ SO ₄ - | 0,9 g/dm ³ |
| ○ Cytrynian sodu - | 3,0 g/dm ³ |
| ○ Roztwór pierwiastków śladowych | 3 cm ³ |
| ▪ MnSO ₄ x H ₂ O | 1 g/dm ³ |
| ▪ ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 2,78 g/dm ³ |
| ▪ CoCl ₂ x 7 H ₂ O | 2 g/dm ³ |
| ▪ Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 2 g/dm ³ |
| ▪ CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 3 g/dm ³ |
| ▪ CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 1,85 g/dm ³ |
| ▪ H ₃ BO ₄ | 0,5 g/dm ³ |
| ▪ HCl (32%) | 100 ml/dm ³ |

Pożywkę w fermentorze zaszczepia się inokulum i hoduje w odpowiednich warunkach. Jako źródło węgla i energii do wytwarzania biomasy stosuje się stałe dozowanie do fermentora roztworu 40% glukozy (w przypadku szczepów *E. coli* IBA z dodatkiem proliny 10-30 mg/ml) tak, aby jej stężenie wynosiło 70-180 mg/dm³.

pH (7,1+/-0,1) kontroluje się przy pomocy 16% amoniaku przez kaskadę. Poziom tlenu w pożywce utrzymuje się na poziomie nie niższym niż 30-35%. Parametr ten kontrolowany jest w zależności od odczytu z elektrody DO przez zwiększenie obrotów mieszadła z 250 do 1000 rpm i przepływu powietrza z 5 do 10 dm³/min. Po osiągnięciu maksymalnych obrotów mieszadła oraz maksymalnego przepływu powietrza (po ok. 7-10 godz.) zatrzymuje się dodawanie glukozy; wartość OD₆₀₀ wynosi (w przypadku szczepów *E. coli* IBA/pIBA) ok. 25-35.

Po spadku stężenia glukozy, jej dodawanie utrzymywane jest tak, aby stężenie wynosiło ok. 35-50 mg/dm³, a pH było utrzymywane na poziomie 7,1 +/- 0,1. Ta faza biosyntezy prowadzona jest do momentu osiągnięcia przez komórki stacjonarnej fazy wzrostu (nie obserwuje się już wzrostu gęstości optycznej hodowli) i trwa ok. 7-8 godzin. Na koniec fazy produkcji rekombinowanego białka OD₆₀₀ wynosi 50 - 60 w przypadku szczepów *E. coli* IBA/pIBA. Następnie hodowla schładzana jest do temperatury poniżej 20°C, korzystnie ok. 10°C.

Etap 4. Wirowanie

Biomasę odwirowuje się na wirówce stacjonarnej przy 6 000-8 000 rpm w czasie 15 min. i w temperaturze +4 ° C. Brzeczkę pofermentacyjną można odwirować na wirówce przepływowej

Etap 5. Izolacja ciałek inkluzyjnych

Biomasę zawiesza się w 1 dm³ buforu 50 mM TRIS, 0.5 M NaCl i 5 mM beta-merkaptoetanolu, o pH 7,5, dodaje się lizozym do stężenia 0,43 mg/cm³ i 0,2M EDTA do stężenia 0,5%, po czym

inkubuje się przez 30 minut w temperaturze pokojowej i poddaje dezintegracji przez sonikację lub ciśnienie.

Etap 6 - wariant 1: Sonikacja.

Materiał chłodzi się do ok. 10°C, dzieli się na 4 części, dodaje Triton do 1% i każdą porcję sonikuje się przez 30 minut przy amplitudzie 33%. Po sonikacji próbę odwirowuje się przy 8000 rpm przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie osad zawiesza się w 1 dm³ buforu 50 mM TRIS, 0,5 M NaCl i 5 mM betamerkaptoetanolu, o pH 7,5 i ponownie sonikuje przez 10 min. Ciała inkluzyjne odwirowuje się przy 8000 rpm przez 15 min w temperaturze pokojowej.

Etap 6 - wariant 2: Dezintegracja ciśnieniowa.

Materiał chłodzi się do ok. 10°C, poddaje się dezintegracji ciśnieniowej (Panda+1000 firmy GEA Niro Soavi) przy ciśnieniu 800 bar z szybkością zapewniającą całkowite rozbicie komórek (kontrola mikroskopowa) i chłodząc zawiesinę tak, aby temperatura nie przekroczyła ok. 10°C.

Etap 7. Rozpuszczanie ciał inkluzyjnych

Ciała inkluzyjne rozpuszcza się w odpowiedniej ilości 12 mM buforu wodorowęglanowego i 0,2 mM EDTA do uzyskania wartości absorbancji poniżej 9 przy długości fali 280 nm. Roztwór doprowadza się do pH do wartości 11,5±0,5 za pomocą 2 M NaOH i miesza przez 30 min. w temp pokojowej. Następnie koryguje się pH do 10,8±0,4 za pomocą 2 M HCl. Roztwór klaruje się przez wirowanie przy 12 500 rpm przez 15 min w temp. 4°C.

Etap 8. Renaturacja

Po rozpuszczeniu ciał inkluzyjnych białko renaturuje się przez napowietrzanie - silne mieszanie przez ok. 16-18h w temperaturze pokojowej. Następnie koryguje się pH do wartości 9,0 za pomocą 2 M HCl.

Etap 9. Cytrakonylacja

Do roztworu białka dodaje się porcjami bezwodnika cytrokonylowego w ilości obliczonej według wzoru: objętość bezwodnika (cm³) = 0,15 x objętość roztworu [dm³] x A₂₈₀ oraz 2 M

NaOH do utrzymania pH o wartości w przedziale 8,7-9,3. Po dodaniu całej ilości bezwodnika roztwór miesza się przez 1 godzinę, po czym dodaje się roztwór 2 M etanolaminy w trzykrotnej objętości bezwodnika i miesza przez 30min.

Etap 10. Trypsynowanie

Po cytrakonylacji pH roztworu koryguje się do wartości 8,8 za pomocą 2 M HCl i rozcieńcza wodą tak, aby przewodnictwo wyniosło poniżej 5 mS. Następnie dodaje się 1% roztwór trypsyny w ilości obliczonej według wzoru: objętość roztworu trypsyny = $A_{280} \times \text{objętość roztworu [dm}^3] / 95$) i miesza przez 16-18 godzin w temperaturze pokojowej. Reakcję hamuje się roztworem aprotyniny o stężeniu 1 mg/ml, dodawanego w ilości dwudziestojednokrotnie mniejszej od objętości trypsyny.

Etap 11. Odcięcie białka liderowego - ubikwityny.

Do roztworu białka o temperaturze 10°C dodaje się 20 mM kwas fosforowy do uzyskania pH o wartości 7,5, po czym w temperaturze 37°C dodaje się 19,2 cm³ roztworu proteazy UBP1ΔC lub UBP1ΔC2 o stężeniu 1 mg/cm³. i miesza się przez 1 godzinę. Po ochłodzeniu do 4°C roztwór klaruje się przez wirowanie przy 12 000 rpm przez 15 minut.

Etap 12. Chromatografia niskociśnieniowa na złożu DEAE Sepharosa

Na kolumnę wypełnioną złożem DEAE (200 cm³) i zrównoważoną 0,5 M TRIS o pH 8,6±0,2, a następnie 20 mM TRIS o pH 8,6±0,2 nanosi się roztwór o pH 8,6±0,2. Po naniesieniu kolumnę płucze się buforami o pH 8,6±0,2: 20 mM TRIS z NaCl do przewodności 5mS ±1 mS, a następnie 20 mM TRIS z NaCl do przewodności 2 mS±1 mS i 20%±5% izopropanolu. Białko insuliny eluuje się buforem o pH 8,6±0,2, składającym się z 20 mM TRIS z NaCl do przewodności 5±1mS i z dodatkiem 25%±5% izopropanolu.

Etap 13. Decytrakonylacja

Frację główną wyeluowaną z kolumny rozcieńcza się 2 razy, ochładza do 4°C i zakwasza 0,1 M HCl do pH o wartości 2,9±0,2, po czym miesza się 10 godzin.

Etap 14. Strącanie insuliny chlorkiem cynku.

Do rozcieńczonej frakcji głównej dodaje się taką objętość 1 M chlorku cynku, która odpowiada 1/50 objętości frakcji głównej, koryguje się pH do wartości $5,5 \pm 0,5$ i miesza przez 1 godzinę. Następnie zawiesinę odwirowuje się przy 9000 rpm przez 15 min w 4°C . Otrzymany osad zawiesza się w wodzie.

Etap 15. Chromatografia niskociśnieniowa na złożu Q Sepharosa.

Zawiesinę insuliny uzupełnia się wodą do objętości wyliczonej z wzoru: objętość końcowa = całkowita ilość białka otrzymanego po DEAE $[\text{AU } A_{280}]/7$, dodaje TRIS o pH 8,6 do stężenia 30 mM i 0,2 M roztwór EDTA w ilości wyliczonej z wzoru: objętość $[\text{cm}^3] = \text{całkowita ilość białka otrzymanego po DEAE } [\text{AU } A_{280}]/190$, po czym doprowadza się pH do wartości 8,6. Na kolumnę wypełnioną złożem Q (80 cm^3) i zrównoważoną 0,5 M TRIS o pH 8,6, a następnie 20 mM TRIS o pH 8,6, nanosi się roztwór rozpuszczonej soli cynkowej insuliny o pH 8,6. Po naniesieniu kolumnę płucze się buforem 20 mM TRIS z $20\% \pm 5\%$ izopropanolu o pH 8,6, a następnie eluuje się białko insuliny buforem o pH 8,6, składającym się 20 mM TRIS z NaCl do przewodności $3 \text{ mS} \pm 2 \text{ mS}$ i $25\% \pm 5\%$ izopropanolu.

Etap 16. Reakcja z karboksypeptydazą B.

Frację główną wyeluowaną z kolumny rozcieńcza się 2 razy i dodaje roztwór karboksypeptydazy B o stężeniu $2,5 \text{ mg/cm}^3$ w ilości obliczonej z wzoru: objętość $[\mu\text{m}^3] = \text{całkowita ilość białka otrzymanego po Q } [\text{AU } A_{280}]/15$. pH roztworu doprowadza się do wartości 8,8, po czym roztwór miesza się przez 16-18 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie pH doprowadza się do 3 i roztwór poddaje się oczyszczaniu przez chromatografię wysokociśnieniową.

Etap 17. Chromatografia wysokociśnieniowa RP-HPLC.

Rozdział prowadzi się na kolumnie Kromasil C8 lub C18 z zastosowaniem gradientu acetonitrylu:

Faza A	Faza B
95%	5%

75%

25%

Faza ruchoma A: 2000 cm³ 0,2 M roztworu siarczanu sodu z 440 cm³ acetonitrylu, o pH 2,3 i o temperaturze 25-30°C;

Faza ruchoma B: 1250 cm³ 0,2 M roztworu siarczanu sodu z 1250 cm³ acetonitrylu, o pH 2,3 i o temperaturze 25-30°C;

Roztwór po reakcji z karboksypeptydazą B lub frakcję główną po oczyszczaniu na złożu Q Sepharosa po dwukrotnym rozcieńczeniu i doprowadzeniu pH do wartości 3, oczyszcza się porcjami, nanosząc na kolumnę jednorazowo objętość roztworu o zawartości białka całkowitego 200 AU, po czym zbiera frakcję główną tak, aby czystość produktu (HPLC) wynosiła co najmniej 98%.

Etap 18. Strącanie insuliny chlorkiem cynku.

Połączone frakcje główne po chromatografii wysokociśnieniowej rozcieńcza się 2 razy i dodaje 1 M ZnCl₂ w proporcji 3 cm³ chlorku cynku na 150 cm³ próbki, po czym pH doprowadza się do wartości 6±1 i miesza przez 1 godzinę. Następnie zawiesinę wiruje się przy 9000 rpm przez 15 min w 4°C, a osad zawiesza się w 10-15 cm³ wody.

Etap 19. Chromatografia na złożu Sephadex G-25 i liofilizacja.

Zawiesinę osadu doprowadza się do pH 3, filtruje przez filtr 0,22µm i nanosi na kolumnę wypełnioną nośnikiem Sephadex G 25 (120 cm³). Przed naniesieniem kolumnę równoważy się 5 mM octanem amonu o pH 4, a białko wymywa się 5 mM octanem amonu o pH 4. Tak otrzymaną substancję poddaje się liofilizacji.

II. Przykłady szczegółowe

Przykład 1. Insulina ludzka LysB28ProB29 (insulina lispro)
Zgodnie z powyżej podaną ogólną procedurą prowadzenia procesu (punkt I), przeprowadzono wytwarzanie biosyntetycznej insuliny lispro, stosując etapy 1-6, 6b, 7-10 i 12-19 oraz dla systemu ekspresji 1.2. i 1.5. dodatkowo etap 11 (Tabela 1. Insulina lispro). Proces badano w 20 wariantach 8 systemów ekspresji białka. Z otrzymanych danych wynika, że sprawdzające się w

warunkach laboratoryjnych szczepy bakterii *Escherichia coli* DH5 α , DH5 i HB101 z plazmidami z promotorami *deoP1P2* i *pms* nie są odpowiednie dla hodowli produkcyjnej z pożywką minimalną (system 1.3., 1.4., 1.5., 1.6. i 1.7.). Szczepy te charakteryzują się niskim wzrostem na minimalnej pożywce technologicznej, wykazując znacznie niższą wartość gęstości optycznej w fermentorach produkcyjnych. Podobnie mała przydatność produkcyjną wykazuje system szczepu IBA z uszkodzonym represorem *cytR* i z plazmidem *pIGAL* (system 1.8.), charakteryzujący się stosunkowo lepszym wzrostem, lecz niską zawartością ciał inkluzyjnych (obserwacje mikroskopowe).

Najlepszą wydajnością ekspresji charakteryzuje się system szczepu IBA/pIBA, opisany w patencie polskim nr PL 180 818, który zbadano w 4 wariantach peptydu łącznikowego i 2 wariantach białka liderowego (system 1.1. i 1.2.). Wszystkie charakteryzują się dobrymi, porównywalnymi parametrami wzrostu w pożywce minimalnej, lecz różnią się masą ciał inkluzyjnych i względną wydajnością renaturacji peptydu fuzyjnego oraz – w związku z tym – końcową wydajnością produktu.

Najwyższą wydajność insuliny lispro uzyskano wykorzystując system ekspresji *E. coli* IBA/pIBA wytwarzający łańcuch A połączony z łańcuchem B insuliny lispro dipeptydem ArgArg (Tabela 1, L.p przykładu 1.1.1. i 1.2.1.), przewyższający wydajność pozostałych systemów co najmniej o 13-15%.

Przykład 2. Insulina GlyA22ArgB31 (insulina GR).

Zgodnie z powyżej podaną ogólną procedurą prowadzenia procesu (punkt I), przeprowadzono wytwarzanie biosyntetycznej insuliny GR, stosując etapy 1-6, 6b, 7-10, 12-15 i 17-19 oraz dla systemu ekspresji 2.2. dodatkowo etap 11 (Tabela 2. Insulina GR). Proces badano w 12 wariantach 5 systemów ekspresji białka (nie stosowano wariantu z łącznikiem LysArg, jako nieprowadzącego do insuliny GR). Otrzymane dane potwierdzają wnioski z przykładu 1, dotyczące wyższości systemu ekspresji

opisanego w patencie polskim nr PL 180 818 nad innymi badanymi oraz wykazują podobne różnice w wydajności procesu w zależności od rodzaju peptydu łącznikowego łączącego łańcuch A i B tego analogu insuliny. W szczególności najwyższą wydajność insuliny GR uzyskano wykorzystując system ekspresji *E. coli* IBA/pIBA, wytwarzający łańcuch A połączony z łańcuchem B insuliny GR dipeptydem ArgArg (Tabela 2, L.p przykładu 2.1.1. i 2.2.1.) i przewyższający wydajność pozostałych systemów co najmniej o 16%-22%. Z przedstawionych rezultatów wynika przewaga technologiczna łącznika ArgArg bez względu na rodzaj białka liderowego.

Przykład 3. Insulina ludzka.

Zgodnie z powyżej podaną ogólną procedurą prowadzenia procesu, przeprowadzono wytwarzanie biosyntetycznej insuliny ludzkiej w 8 wariantach 2 systemów ekspresji białka. W badaniach prowadzono etapy 1-6, 6b, 7-10 i 12-19 oraz dla systemu ekspresji 1.2. i 1.5. dodatkowo etap 11. Z otrzymanych danych wynika (Tabela 3. Insulina ludzka), że najlepszą wydajnością ekspresji charakteryzuje się system szczepów IBA/pIBA, wykazujących się dobrymi, porównywalnymi parametrami wzrostu w przemysłowej pożywce minimalnej i różniących się masą wytworzonych ciał inkluzyjnych oraz względną wydajnością renaturacji. Ponownie najwyższą wydajność insuliny ludzkiej uzyskano wykorzystując system ekspresji *E. coli* IBA/pIBA wytwarzający łańcuch A połączony z łańcuchem B insuliny ludzkiej dipeptydem ArgArg (Tabela 3, L.p przykładu 3.1.1. i 3.2.1. Badania analityczne, prowadzone w poszczególnych etapach procesu wykazują, że wyższą wydajność w tym wariantach systemu ekspresji - o 14%-16 % - osiąga się po etapie wytwarzania ciał inkluzyjnych i renaturacji, przy czym utrzymuje się ona przez wszystkie pozostałe etapy procesu.

Przykład 4. Insulina ludzka SerA22ArgB31 (insulina SR).

Badania wydajności procesu wytwarzania insuliny SR przeprowadzono zgodnie z powyżej podaną ogólną procedurą (punkt I), realizując etapy 1-6, 6b, 7-10, 12-15 i 17-19 oraz dla systemu ekspresji 4.2. dodatkowo etap 11 (Tabela 2. Insulina GR). Proces badano w 12 wariantach 5 systemów ekspresji białka (nie stosowano wariantu z łącznikiem LysArg, jako nieprowadzącego do insuliny SR). Otrzymane dane potwierdzają poprzednie wyniki, stale wykazując wyższą wydajność systemu ekspresji *E. coli* IBA/pIBA, wytwarzającego łańcuch A połączony z łańcuchem B insuliny SR dipeptydem ArgArg (Tabela 4, L.p przykładu 4.1.1. i 4.2.1.) w porównaniu z innymi peptydami łącznikowymi tego systemu - co najmniej o 15%.

Przykład 5. Insulina SerA22LizB3ArgB31 (insulina SK3R)

Zgodnie z powyżej podaną ogólną procedurą prowadzenia procesu, przeprowadzono wytwarzanie biosyntetycznej insuliny SK3R w 6 wariantach 2 systemów ekspresji białka. W badaniach prowadzono etapy 1-6, 6b, 7-10, 12-15 i 17-19 oraz dla systemu ekspresji 5.2. dodatkowo etap 11. Z otrzymanych danych wynika (Tabela 5. Insulina SK3R), że najlepszą wydajnością ekspresji charakteryzuje się system szczepów IBA/pIBA, wykazujących się dobrymi, porównywalnymi parametrami wzrostu w przemysłowej pożywkę minimalnej i różniących się masą wytworzonych ciał inkluzyjnych oraz względną wydajnością renaturacji. Ponownie najwyższą wydajność insuliny ludzkiej uzyskano wykorzystując system ekspresji *E. coli* IBA/pIBA wytwarzający łańcuch A połączony z łańcuchem B insuliny ludzkiej dipeptydem ArgArg (Tabela 5, L.p przykładu 5.1.1. i 5.2.1. Wyczerpujące badania analityczne, prowadzone w poszczególnych etapach procesu wykazują, że wyższa wydajność w tych wariantach systemu ekspresji utrzymuje się przez wszystkie etapy procesu po

etapie wytwarzania ciał inkluzyjnych i renaturacji, wydajność ta jest wyższa od uzyskanej z innych wariantów systemu ekspresji przynajmniej o 14%-16%.

Przykład 6. Preproinsulina (prekursor) G: białko liderowe - łańcuch B - łącznik - łańcuch A:dezAsnA21GlyA21.

Uniwersalność przewagi łącznika ArgArg nad innymi w ekspresji preproinsuliny wykazano również badając wydajność wytwarzania białka składającego się z białka liderowego poprzedzającego łańcuch B, który był połączony badanymi łącznikami z modyfikowanym łańcuchem A insuliny (A:dezAsnA21GlyA21). Badania zrealizowano przeprowadzając krytyczne etapy 1-8 ogólnej procedury prowadzenia procesu w 8 wariantach 2 systemów ekspresji. Wyniki badań, przedstawione w Tabeli 6. Preproinsulina (prekursor) G: białko liderowe - łańcuch B - łącznik - łańcuch A:dezAsnA21GlyA21 wykazują, że w przypadku łącznika ArgArg wydajność procesu jest wyższa o 10 %, niż w pozostałych przypadkach.

Na podstawie końcowej wydajności produktu, potwierdzonej zawartością białka przed oczyszczeniem, nieoczekiwanie okazało się, że najlepsze wyniki w wytwarzaniu rekombinowanej insuliny ludzkiej i jej analogów osiąga się w systemie ekspresji składającym się z plazmidu ekspresyjnego z promotorem *deoP1P2* w szczepach bakterii *Escherichia coli* pozbawionych genu represora *cytR* (patent polski nr PL 180 818), jeżeli w plazmidzie kodującym białko fuzyjne łańcuch A insuliny jest połączony z łańcuchem B za pomocą dipeptydu ArgArg. Co więcej, różnica w wydajności między wariantem systemu z dipeptydem ArgArg a LysArg wynosi 13%-22% i jest porównywalna z opisanym w patencie polskim nr PL 180 818 postępowaniem w wydajności systemu z dipeptydem LysArg i Arg w porównaniu z systemem z peptydem C, wynoszącym odpowiednio 23% i 17%.

**Konstrukcja genetyczna plazmidu pIBA i pIBA/INS
[pIBA/INSLys (31B)Arg (32B)]**

Plazmid pIBA/INS o wielkości 4354 par zasad jest zbudowany z następujących sekwencji regulatorowych oraz genów:

- od 7 pz do 942 pz zlokalizowany jest region regulatorowy z promotorami *deoP1P2*,
- od 946 pz do 1137 pz znajduje się sekwencja kodująca fragment ludzkiego genu SOD,
- od 1138 pz do 1299 pz zawarta jest sekwencja kodująca łańcuchy A, B oraz łańcuch C (w postaci łącznika Lys-Arg) rekombinowanej ludzkiej insuliny INS, sekwencja nukleotydowa insuliny została zmieniona zgodnie z częstością występowania kodonów w *E. coli*,
- od 1312 pz do 1338 pz zlokalizowany jest region kodujący terminator transkrypcji Ter *trpA*,
- od 1508 pz do 2698 pz znajduje się gen oporności na tetracyklinę Tet,

Strukturę plazmidu pIBA przedstawiono schematycznie na Fig.1, a jego sekwencję nukleotydową i aminokwasową na Fig.2. Strukturę plazmidu pIBA/INS zawierającego przykładowy gen kodujący białko rekombinowanej insuliny ludzkiej, w której łańcuch A jest połączony z łańcuchem B dipeptydem LysArg przedstawiono schematycznie na Fig.3, a jego sekwencję nukleotydową i aminokwasową na Fig.4.