



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 919 T2** 2007.11.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 486 511 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/65** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 919.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 006 513.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **15.08.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.12.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **24.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.11.2007**

(30) Unionspriorität:

110664 20.08.1993 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(72) Erfinder:

**Builder, Stuart, Belmont CA 94002, US; Lester,
Phillip, San Lorenzo CA 94580, US; Hart, Roger,
Burlingame CA 94010, US; Reifsnnyder, David, San
Mateo CA 94403, US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **Faltung von Polypeptiden**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft spezielle Pufferlösungen und ihre Verwendung zur Umfaltung von Polypeptiden.

Beschreibung des Stands der Technik

[0002] DNA-Rekombinationsverfahren sind aufgrund der großen Mengen, die in Bakterien und anderen Wirtszellen produziert werden können, zum Wahlverfahren in der kommerziellen Produktion vieler Polypeptide und Proteine geworden. Die Herstellung rekombinanter Proteine involviert die Transfektion oder Transformation von Wirtszellen mit DNA, die für das gewünschte exogene Protein kodiert, und das Wachsenlassen der Zellen unter Bedingungen, die die Expression des rekombinanten Proteins fördern. *E. coli* und Hefe werden als Wirte bevorzugt, da sie dazu gebracht werden können, rekombinante Proteine bei hohen Titern zu erzeugen.

[0003] Es existieren zahlreiche US-Patente über die allgemeine bakterielle Expression von durch rekombinante DNA kodierten Proteinen, unter anderem US-Patent Nr. 4.565.785 bezüglich eines rekombinanten DNA-Moleküls, das ein bakterielles Gen für ein extrazelluläres oder periplasmatisches Trägerprotein und ein nicht bakterielles Gen umfasst; 4.673.641 bezüglich der Co-Produktion eines fremden Polypeptids mit einem aggregatbildenden Polypeptid; 4,738.921 bezüglich eines Expressionsvektors mit einem *trp*-Promotor/Operator und einer *trp*-LE-Fusion mit einem Polypeptid, wie z.B. dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF-I); 4.795.706 bezüglich Expressionskontrollsequenzen, die in ein fremdes Protein zu inkludieren sind; sowie 4.710.473 bezüglich spezifischer kreisförmiger DNA-Plasmide, wie z.B. jene, die für IGF-I kodieren.

[0004] Unter manchen Bedingungen werden gewisse heterologe Proteine, die in großen Mengen aus bakteriellen Wirten exprimiert werden, in den Zellen in dichten Aggregaten präzipitiert, zu erkennen als helle Punkte, die unter einem Phasenkontrast-Mikroskop innerhalb der Abgrenzung der Zellen sichtbar sind. Diese Aggregate präzipitierter Proteine werden als „Refraktil-Körper“ bezeichnet und stellen einen signifikanten Teil des gesamten Zellproteins dar. Brems et al., *Biochemistry* 24, 7662 (1985). Auf der anderen Seite können die Proteinaggregate mitunter unter dem Phasenkontrast-Mikroskop nicht sichtbar sein, und der Begriff „Einschlusskörper“ wird oftmals verwendet, um die Proteinaggregate zu beschreiben, egal ob diese unter dem Phasenkontrast-Mikroskop sichtbar sind oder nicht.

[0005] Es wurde herausgefunden, dass der lösliche Anteil des hochgradig exprimierten Proteins in *E. coli* durch Herabsetzen der Fermentationstemperatur auf unter 30 °C dramatisch angehoben wurde. Ein beachtlicher Teil verschiedener fremder Proteine, d.h. menschliches Interferon- α (IFN- α 2), Interferon- γ (IFN- γ) und murines MX-Protein [Schein und Noteborn, *Bio/Technology* 6, 291-294 (1988)] sowie menschliches IFN- β [Mizukami et al., *Biotechnol. Lett.* 8, 605-610 (1986)], verblieb in Lösung. Dieses Verfahren stellt eine Alternative zu der Renaturierung von Proteinen dar, die aus Refraktil-Körpern gewonnen wurden, benötigt jedoch ein Expressionssystem, das wirksam bei Temperaturen unter 30 °C induziert wird. Das Verfahren wirkt daher nicht bei allen Proteinen.

[0006] Für Artikel, die zu Refraktil-Körpern einen allgemeinen Überblick geben, siehe Marston, s.o.; Mitraki und King, *Bio/Technology* 7, 690 (1989); Marston und Hartley, *Methods in Enzymol.* 182, 264-276 (1990); Wetzel, *Protein Aggregation In Vivo: Bacterial Inclusion Bodies and Mammalian Amyloid, Stability of Protein Pharmaceuticals: In Vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization*, Ahern und Manning (Hrsg.), Plenum Press (1991); und Wetzel, *Enhanced Folding and Stabilization of Proteins by Suppression of Aggregation In Vitro and In Vivo, Protein Engineering-Practical Approach*, A.R. Rees et al. (Hrsg.), IRL Press, Oxford University Press, Oxford (1991).

[0007] Die Gewinnung des Proteins aus diesen Körpern stellte zahlreiche Probleme dar, z.B. die Trennung des in die Zelle eingebetteten Proteins von zellulärem Material und den Proteinen, die es in sich tragen, und die Gewinnung des Einschlusskörper-Proteins in biologisch aktiver Form. Die gewonnenen Proteine sind oftmals vorwiegend biologisch inaktiv, da sie in eine dreidimensionale Konformation gefaltet sind, die sich von jener eines aktiven Proteins unterscheidet. Fehlgefalteter IGF-I mit anderen Disulfidbindungspaaren als sie bei nativem IGF-I zu finden sind reduzierte z.B. die biologische Aktivität signifikant. Raschdorf et al., *Biomedical and Environmental Mass Spectroscopy* 16, 3-8 (1988). Eine Fehlfaltung tritt entweder während der Fermenta-

tion in der Zelle oder während des Isolationsverfahrens auf. Verfahren zur Umfaltung der Proteine in die korrekte, biologisch aktive Konformation sind für den Erhalt funktioneller Proteine essentiell.

[0008] Eine weitere Eigenschaft von Proteinen während der Umfaltung ist die Tendenz, disulfidgebundene Dimere, Trimere und Multimere zu produzieren. Morris et al., *Biochem. J.* 268, 803-806 (1990); Toren et al., *Anal. Biochem.* 169, 287-299 (1988); Frank et al., *Peptides: synthesis-structure-function*, 729-738, D.H. Rich und E. Gross (Hrsg.), Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1991). Dieses Assoziierungs-Phänomen ist während der Protein-Umfaltung sehr häufig, insbesondere bei höheren Proteinkonzentrationen, und scheint oftmals eine Assoziation durch eine hydrophobe Wechselwirkung partiell gefalteter Zwischenprodukte zu involvieren. Cleland und Wang, *Biochemistry* 29, 11072-11078 (1990).

[0009] Die Proteinfaltung wird durch die Art des proteinhaltigen Mediums und durch eine Kombination schwach anziehender oder abstoßender intramolekularer Kräfte beeinflusst, die in die Wasserstoffbindung, in die Ionenbindung und in hydrophobe Wechselwirkungen involviert sind. Werden Paare von Cystein-Resten in große Nähe gebracht, während sich das Peptid-Rückgrat faltet, so bilden sich starke kovalente Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten, die dazu dienen, die tertiäre Konformation an ihrem Platz zu halten. Die Umfaltungs-Arbeitsvorschriften wurden erstellt, um inkorrekte Disulfidbrücken aufzubrechen, um eine zufällige Disulfidbindung zu blockieren und um eine Umfaltung und eine korrekte Disulfidbindung unter Bedingungen zu ermöglichen, die für die Bildung eines aktiven Konformers förderlich sind.

[0010] Eine Reihe an Verfahren zur Gewinnung von aktivem Protein aus Einschlusskörpern involviert die Solubilisierung der Einschlusskörper in stark denaturierenden Lösungen und anschließend gegebenenfalls das Austauschen der stark denaturierenden Lösungen gegen schwach denaturierende Lösungen (oder das Verdünnen der stark denaturierenden Lösung) oder die Verwendung eines Molekularsiebs oder von Hochgeschwindigkeits-Zentrifugierungsverfahren. Solche Gewinnungsverfahren, beschrieben z.B. in den US-Patenten Nr. 4.512.922; 4.518.256; 4.511.502; und 4.511.503, werden mit nur kleineren Modifikationen als universell auf die Gewinnung biologisch aktiver rekombinanter Proteine aus Einschlusskörpern anwendbar angesehen. Mit diesen Verfahren wird versucht, zufällig gebildete Disulfidbindungen zu eliminieren, bevor das rekombinante Protein dazu gebracht wird, seine biologisch aktive Konformation durch seine anderen stabilisierenden Kräfte anzunehmen.

[0011] In einem Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus Einschlusskörpern wird das denaturierte Protein, das umgefaltet werden soll, weiter unter reduzierenden Bedingungen gereinigt, die die Cystein-Gruppierungen des Proteins als freie Sulfhydrylgruppen beibehalten. Das Reduktionsmittel wird anschließend in eine wässrige Lösung verdünnt, um es dem umgefalteten Protein zu ermöglichen, die geeigneten Disulfidbindungen in Gegenwart von Luft oder einem anderen oxidierenden Agens auszubilden. Dies ermöglicht eine leicht in den gesamten Reinigungsprozess zu inkorporierende Umfaltung.

[0012] In einem anderen Ansatz findet eine Umfaltung des rekombinanten Proteins in Gegenwart von sowohl den reduzierten (R-SH) als auch den oxidierten (R-S-S-R) Formen einer Sulfhydrylverbindung statt. Dies ermöglicht die Bildung und konstante Neubildung freier Sulfhydrylgruppen und Disulfide während des Reinigungsprozesses. Die reduzierten und oxidierten Formen der Sulfhydrylverbindung werden in einem Puffer bereitgestellt, der ausreichend denaturierende Kraft besitzt, so dass alle der Zwischenkonformationen des Proteins während der Auffaltung und Umfaltung löslich bleiben. Harnstoff wird als geeignetes Puffermedium vorgeschlagen. Die dritte Alternative in dieser Serie ist darauf ausgelegt, etwaige Disulfidbindungen aufzubrechen, die sich während der Isolierung der Einschlusskörper inkorrekt gebildet haben könnten, sowie anschließend die verfügbaren freien Sulfhydrylgruppen des rekombinanten Proteins zu derivatisieren. Dieses Ziel wird durch Sulfonieren des Proteins erreicht, um zufällige Disulfidpaarungen zu blockieren, was es dem Protein ermöglicht, sich in einer schwach denaturierenden Lösung korrekt umzufalten, sowie durch Desulfonieren des Proteins unter Bedingungen, die die korrekte Disulfidbindung fördern. Die Desulfonierung findet in Gegenwart einer Sulfhydrylverbindung und einer geringen Menge ihrer korrespondierenden oxidierten Form statt, um sicherzustellen, dass geeignete Disulfidbindungen intakt bleiben. Der pH wird auf einen Wert angehoben, so dass die Sulfhydrylverbindung zumindest partiell eine ionisierte Form aufweist, um die nucleophile Ersetzung des Sulfonats zu steigern.

[0013] Diese Umfaltungsarbeitsvorschriften erwiesen sich trotz ihres praktischen Nutzens aufgrund ihres universellen Nutzens z.B. bei rekombinantem IGF-I nicht notwendigerweise als in maximalem Ausmaß wirksam.

[0014] Die Gewinnung der biologischen Aktivität erfordert eine vorsichtige Beobachtung des Renaturierungsverfahrens und kann in Abhängigkeit vom jeweiligen Protein sehr schwer sein. Es sind eine Reihe an Publika-

tionen erschienen, die über Umfaltungsversuche bei einzelnen Proteinen berichten, die in bakteriellen Wirten produziert werden oder andernfalls in einer denaturierten oder nicht nativen Form vorliegen. Die Bildung eines dimeren, biologisch aktiven Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) nach der Expression in *E. coli* wird z.B. in WO 88/8003 und von Halenbeck et al., *Biotechnology* 7, 710-715 (1989), beschrieben. Die beschriebenen Verfahren umfassen die Schritte der anfänglichen Solubilisierung von M-CSF-Monomeren, die aus Einschlusskörpern unter reduzierenden Bedingungen in einer chaotropen Umgebung, umfassend Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, isoliert werden, der Umfaltung, die durch schrittweise Verdünnung der chaotropen Agenzien erreicht wird, und der finalen Oxidation der umgefalteten Moleküle in Gegenwart von Luft oder eines Redox-Systems.

[0015] Die US-Patente Nr. 4.923.967 und EP 361.830 beschreiben eine Arbeitsvorschrift zur Solubilisierung und Sulphitolyse von refraktilem Protein in Denaturierungsmittel, wonach das Lösungsmittel ausgetauscht wird, um das Protein zu präzipitieren. Das Protein wird erneut in Denaturierungsmittel solubilisiert, und es wird ihm ermöglicht, sich in Gegenwart des Reduktionsmittels umzufalten. Die multiplen Schritte, die erforderlich sind, um eine korrekte Faltung zu erreichen, sind zeitaufwändig.

[0016] Verfahren zur Umfaltung von Proteinen wurden für mehrere Proteine beschrieben, wie z.B. Interleukin-2 (IL-2) [Tsuji et al., *Biochemistry* 26, 3129-3134 (1987); WO 88/8849 (das auf S. 17 die Verwendung von hohen Konzentrationen an Kupfer als Oxidans offenbart), Wachstumshormone verschiedenen Ursprungs [George et al., *DNA* 4, 273-281 (1984); Gill et al., *Bio/Technology* 3, 643-646 (1985); Sekine et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4306-4310 (1985); US-Patent Nr. 4.985.544, wobei der letzte Verweis die Hinzufügung eines denaturierenden Agens und eines Reduktionsmittels involviert, um das Protein zu solubilisieren, sowie die Entfernung des Reduktionsmittels, die Oxidation des Proteins und die Entfernung des denaturierenden Agens], Prochymosin [Green et al., *J. Dairy Res.* 52, 281-286 (1985)], Urokinase [Winkler et al., *Bio/Technology* 3, 990-1000 (1985)], Somatotropin [US-Patent Nr. 4.652.630, wobei Harnstoff für die Solubilisierung verwendet wird und danach ein mildes oxidierendes Agens für die Umfaltung angewandt wird], Interferon- β [EP 360.937, veröffentlicht am 4. April 1990] und der Gewebe-Plasminogenaktivator [Rudolph et al., 623. Treffen der Biochem. Soc., Canterbury (1987)]. Siehe auch Marston, *Biochemical J.* 240, 1-12 (1986). Ein zusätzliches Faltungsverfahren unter Verwendung der Pro-Sequenz des natürlich vorkommenden Polypeptids zur Förderung der Faltung eines biologisch inaktiven Polypeptids zu seiner aktiven Form, beispielsweise durch Subtilisin dargestellt, ist im US-Patent Nr. 5.191.063 offenbart.

[0017] In bestimmten Gewinnungsverfahren wurde zumindest bis zu 60 % aktives fremdes Protein erhalten. Siehe z.B. Boss et al., *Nucl. Acids Res.* 12, 3791-3806 (1984); Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3273-3277 (1984); Marston et al., *Bio/Technology* 2, 800-804 (1984); Rudolph et al., s.o.

[0018] Zusätzliche, repräsentative Literatur über die Umfaltung von nicht nativen Proteinen, die aus verschiedenen Quellen stammen, umfasst einen Bericht darüber, dass IL-2 und Interferon- β (IFN- β) unter Verwendung von SDS zur Solubilisierung und Cu^{+2} -Ionen als Oxidations-Promotoren der vollständig reduzierten Proteine umgefaltet wurden. US-Patent Nr. 4.572.798. Ein Verfahren zur Isolierung rekombinanter refraktiler Proteine, wie in US-Patent Nr. 4.620.948 beschrieben, involviert die Verwendung von stark denaturierenden Lösungen zur Solubilisierung der Proteine, von reduzierenden Bedingungen zur Erleichterung der korrekten Faltung sowie den Ersatz des Denaturierungsmittels in Gegenwart von Luft oder anderen oxidierenden Agenzien, um die Disulfidbindungen erneut auszubilden. Die Proteine, auf die das Verfahren angewandt werden kann, umfassen Urokinase, das menschliche sowie das Rinder- und Schweine-Wachstumshormon, Interferon, den Gewebe-Typ-Plasminogenaktivator, das Maul-und-Klauenseuche-(FMD-)Hüllprotein, Pro-Renin und ein src-Protein.

[0019] Ein Verfahren zur Renaturierung aufgefalteter Proteine, inkludierend die Cytochrom-C-, Ovalbumin- und Trypsin-Inhibitoren, durch reversible Bindung des denaturierten Proteins an eine Festmatrix und durch dessen schrittweise Renaturierung durch Verdünnung des Denaturierungsmittels wird in WO 86/5809 offenbart. Eine modifizierte, monomere Form des menschlichen, aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktors (PDGF), exprimiert in *E. coli*, wurde während der Reinigung S-sulfoniert, um Thiol-Gruppierungen zu schützen, und anschließend in Gegenwart oxidierender Agenzien dimerisiert, um das aktive Protein zu ergeben. Hoppe et al., *Biochemistry* 28, 2956-2960 (1989).

[0020] Zusätzlich dazu offenbart EP 433.225, veröffentlicht am 19. Juni 1991, ein Verfahren zur Herstellung von dimerem, biologisch aktivem, transformierendem Wachstumsfaktor- β -Protein oder eines Salzes davon, worin die denaturierte, monomere Form des Proteins Umfaltungsbedingungen unterworfen wird, die ein solubilisierendes Agens, wie z.B. ein mildes Detergens, ein organisches, mit Wasser mischbares Lösungsmittel und/oder ein Phospholipid umfassen. Das US-Patent Nr. 4.705.848 offenbart die Isolierung eines monomeren,

biologisch aktiven Wachstumshormons aus Einschlusskörpern unter Verwendung eines Denaturierungsschritts mit einem Guanidin-Salz und eines Renaturierungsschritts. Siehe auch Bowden et al., *Bio/Technology* 9, 725-730 (1991), bezüglich zytoplasmatischer und periplasmatischer β -Lactamase-Einschlusskörper sowie Samuelsson et al., *Bio/Technology* 9, 731 (1991), bezüglich der Umfaltung von menschlichen Interferon- γ -Mutanten. Weiters beschreiben Hejnaes et al., *Protein Engineering* 5, 797-806 (1992), die Verwendung eines chaotropen Agens mit IGF-I.

[0021] Es existieren mehrere Literaturverweise bezüglich der Produktion von IGF-I in Bakterien. Diese umfassen EP 128.733, veröffentlicht am 19. Dezember 1984, sowie EP 135.094, veröffentlicht am 27. März 1985, die sich mit der Expression von IGF-I in Bakterien beschäftigen. EP 288.451 beschäftigt sich mit der Verwendung des lamB- oder des ompF-Signals zur Sekretion von IGF-I in Bakterien; Obukowicz et al., *Mol. Gen. Genet.* 215, 19-25 (1988), und Wong et al., *Gene* 68, 193-203 (1988), lehren Ähnliches. EP 286.345 offenbart die Fermentation von IGF-I unter Verwendung eines λ -Promotors.

[0022] Zusätzlich dazu wurden Verfahren zur Herstellung von IGF-I als ein Fusionsprotein vorgeschlagen. EP 130.166 offenbart z.B. die Expression von Fusionspeptiden in Bakterien, und US-Patent Nr. 5.019.500 und EP 219.814 offenbaren eine Fusion von IGF-I mit einem schützenden Polypeptid zur Expression in Bakterien. EP 264.074 offenbart einen zwei-zistronischen met-IGF-I-Expressionsvektor mit einem schützenden Peptid mit einem Molekulargewicht von 500-50.000 [siehe auch US-Patent Nr. 5.028.531 und Saito et al., *J. Biochem.* 101, 1281-1288 (1987)]. Andere IGF-I-Fusionsverfahren umfassen die Fusion mit einem schützenden Peptid, von dem ein rop-Gen abgetrennt wird [EP 219.814], die IGF-I-Multimer-Expression [Schulz et al., *J. Bacteriol.* 169, 5385-5392 (1987)], die Fusion von IGF-I mit dem Luteinisierungshormon (LH) durch einen chemisch spaltbaren Methionyl- oder Tryptophan-Rest an der Verbindungsstelle [Saito et al., *J. Biochem.* 101, 123-134 (1987)] sowie die Fusion mit Superoxid-Dismutase. EP 196.056. Niwa et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 469, 31-52 (1986), beschreiben die chemische Synthese, die Klonierung und die erfolgreiche Expression von Genen für IGF-I, die an ein anderes Polypeptid fusioniert sind. Diese Verfahren, die Fusionsproteine verwenden, erfordern jedoch im Allgemeinen eine relativ lange Leadersequenz und sind auf die Verbesserung der Expression des Einschlusskörper-Proteins ausgerichtet und nicht auf die Verbesserung der Umfaltung des denaturierten rekombinanten Proteins.

[0023] Das US-Patent Nr. 5.158.875 beschreibt ein Verfahren zur Umfaltung von rekombinantem IGF-I, das das Klonieren des IGF-I-Gens mit einer positiv geladenen Leadersequenz vor der Transfektion der DNA in die Wirtszelle umfasst. Die zusätzliche positive Ladung auf dem Amino-Terminus des rekombinanten IGF-I fördert die korrekte Umfaltung, wenn das solubilisierete Protein für eine Zeitspanne von 2-16 Stunden in einer denaturierenden Lösung gerührt wird. Nach der Umfaltung wird die Leadersequenz gespalten, und das aktive rekombinante Protein wird gereinigt. Dieses mehrstufige Verfahren ist jedoch beschwerlich, da zusätzliches Material und zusätzlicher Aufwand erforderlich sind, um eine heterologe Leadersequenz vor dem IGF-I-Gen zu klonieren und anschließend die Leadersequenz aus dem gereinigten Protein zu entfernen.

[0024] Ein weiteres Verfahren zur Erleichterung der In-vitro-Umfaltung von rekombinantem IGF-I umfasst die Verwendung eines solubilisierten Affinitätsfusionspartners, der aus zwei IgG-Bindungsdomänen (ZZ) besteht, die aus einem Staphylococcen-Protein A stammen. Siehe Samuelsson et al., s.o. Dieses Verfahren verwendet die Protein-A-Domäne als Lösungsvermittler von fehlgefaltetem und multimerem IGF-I. Während dieses Verfahrens keine denaturierenden Agenzien oder Redox-Chemikalien verwendet, involviert es die zusätzlichen Schritte der Fusion eines separaten Gens an das IGF-I-Gen sowie der Entfernung des Polypeptids, das von diesem Gen kodiert wird, nach der Expression des Fusionsgens.

[0025] Andere Forscher haben Studien bezüglich der IGF-I-Umfaltung beschrieben, die eine Disulfidaustausch-Äquilibrierung der Umfaltungs-Zwischenprodukte involvieren. So wurde etwa die Umfaltung von IGF-I unter Verwendung von Redox-Puffern untersucht, und es wurden die produzierten, partiell oxidierten IGF-I-Formen von Hober et al., *Biochemistry* 31, 1749-1756 (1992), charakterisiert.

[0026] Der Disulfidaustausch kann auch unter Verwendung des additiven Agens Peptidyl-disulfid-isomerase (PDI) oder Peptidylprolyl-isomerase (PPI) moduliert werden. Siehe z.B. JP-Patentanmeldung Nr. 63294796, veröffentlicht am 1. Dezember 1988; EP 413.440, veröffentlicht am 20. Februar 1991; sowie EP 293.793, veröffentlicht am 7. Dezember 1988.

[0027] Snyder, *J. Biol. Chem.* 259, 7468-7472 (1984), berichtete über eine Verbesserung der ausgewählten Disulfidpaarungen durch Hinzufügen von 50 % Methanol zum Puffer in einer niedrigen Ionenstärke. Die Strategie umfasst eine verstärkte Bildung spezifischer Disulfidbindungen durch das Anpassen elektrostatischer

Faktoren im Medium zur Förderung der Aneinanderlagerung von entgegengesetzt geladenen Aminosäuren, die an die ausgewählten Cystein-Reste angrenzen. Siehe auch Tamura et al., Zusammenfassung und Poster wurden im Rahmen des Elften American Peptide Symposium am 11. Juli 1989 vorgestellt, wobei die Hinzufügung von Acetonitril, DMSO, Methanol oder Ethanol befürwortet wurde, um die Herstellung von korrekt gefaltetem IGF-I zu verbessern.

[0028] Ein Verfahren zur Faltung von AlaGlu-IGF-I, umfassend das Verändern des Redox-Potentials durch Dialyse gegen einen Puffer, der von 20-40 Vol.-% Ethanol enthält, über eine Zeitspanne von bis zu fünf Stunden sowie das Ansäuern des Gemisches, wird in WO 92/03477, veröffentlicht am 5. März 1992, offenbart.

[0029] Methanol wurde in gewissen Konzentrationen bei der Denaturierung von Ribonuclease verwendet. Lustig und Fink, Biochim. Biophys. Acta 1119, 205-210 (1992). Studien anderer Laboratorien deuten darauf hin, dass moderate Alkoholkonzentrationen die Assoziation von insulinähnlichen Peptiden unter Bedingungen, die die Strukturdestabilisierung fördern, reduzieren können. Bryant et al., Biochemistry 31, 5692-5698 (1992); Hua und Weiss, Biochim. Biophys. Acta 1078, 101-110 (1991); Brems et al., Biochemistry 29, 9289-9293 (1990); Ueda et al., JP 62-190199, veröffentlicht am 20. Juli 1987.

[0030] Von anderen Forschern durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass die Lösungspolarität die Tendenz von Peptiden, eine gewisse sekundäre Struktur anzunehmen, beeinflusst. Jackson und Mantsch, Biochim. Biophys. Acta 1118, 139-143 (1992); Shibata et al., Biochemistry 31, 5728-5733 (1992); Zhong und Johnson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4462-4465 (1992). Im Allgemeinen scheint eine reduzierte Lösungspolarität die Bildung einer α -Helix in kurzen Peptiden zu fördern. Jackson und Mantsch, s.o. Spektroskopische Studien über Insulin deuten auch darauf hin, dass moderate Alkoholkonzentrationen den α -Helix-Gehalt erhöhen. Hua und Weiss, s.o.

[0031] Es besteht ein Bedarf für ein wirksames und kostengünstiges Verfahren zur Umfaltung von Polypeptiden, unter anderem unlösliches, fehlgefalteter IGF-I und andere, in die korrekte Konformation, so dass die biologische Aktivität des Polypeptids wiederhergestellt werden kann.

[0032] Dementsprechend ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein wirksames Umfaltungsverfahren für Polypeptide bereitzustellen.

[0033] Ein weiteres Ziel ist es, ein Umfaltungsverfahren bereitzustellen, das keine teuren Disulfidaustausch-Reagenzien, wie z.B. Glutathion, verwendet.

[0034] Ein weiteres Ziel ist es, ein Umfaltungsverfahren bereitzustellen, das kein Produkt herstellt, das Disulfidaddukte enthält.

[0035] Es ist ebenso ein weiteres Ziel, Umfaltungsbedingungen bereitzustellen, die in maximalem Ausmaß wiederholbar, beständig und skalierbar sind.

[0036] Diese und andere Ziele sind für den Fachmann nach dem Stand der Technik offensichtlich.

Zusammenfassung der Erfindung

[0037] Es wurde nun herausgefunden, dass die Verwendung geringer Kupfer- oder Mangankonzentrationen die Disulfidoxidation von Polypeptiden stark erleichtert.

[0038] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur erneuten Aktivierung von fehlgefaltetem IGF-I bereit, das in Wirtszellen enthalten ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Isolieren von IGF-I aus den Wirtszellen;
- (b) das Erhalten von IGF-I in einem alkalischen Puffer, der ein chaotropes Agens und ein Reduktionsmittel in Mengen umfasst, die für die Solubilisierung ausreichen; und
- (c) das Inkubieren des solubilisierten IGF-I bei einer Konzentration von etwa 0,1 bis 15 mg/ml in einem Faltungspuffer mit einem pH von 7-12, umfassend etwa 5-40 Vol.-% eines alkoholischen oder polaren aprotischen Lösungsmittels, etwa 0,2 bis 3 M eines Erdalkali-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalzes, etwa 0,1 bis 9 M eines chaotropen Mittels und etwa 0,01 bis 15 μ M eines Kupfer- oder Mangansalzes, worin eine Sauerstoffquelle eingeführt ist, so dass während der Inkubation eine Umfaltung des IGF-I erfolgt.

[0039] Der Schwerpunkt der Erfindung liegt in der Verwendung eines speziellen Puffers, der eine minimale

Konzentration eines Kupfer- oder Mangansalzes enthält, um die Umfaltung fehlgefalteter Peptide zu verbessern. Die Verwendung von Mangan- oder Kupfersalzen als Oxidationskatalysatoren vermeidet die Notwendigkeit teurerer Disulfidaustausch-Agenzien, wie z.B. Glutathion. Weiters vermeidet das Verfahren die Möglichkeit der Produktion von Polypeptiden, die Disulfidaddukte enthalten, die entstehen können, wenn Disulfidaustausch-Agenzien verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Lösungsbedingungen identifiziert, die für die Umfaltung von fehlgefaltetem IGF-I förderlich sind, das aus prokaryotischen, periplasmatischen, Refraktil-Körpern gewonnen wurde, um korrekt gefalteten IGF-I in hoher Ausbeute zu erhalten.

[0040] Insbesondere wird das Verfahren für nicht native Säugetier-Polypeptide bevorzugt, die rekombinant in prokaryotischen Zellen produziert wurden, wie z.B. Bakterien, unter anderem E. coli, die Refraktil-Körper im Periplasma der Zellen bilden. Zusätzlich dazu führt die hierin beschriebene Erfindung zu höheren Proteinausbeuten, und zwar unabhängig von der im Reaktionsgemisch verwendeten Proteinkonzentration.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0041] [Fig. 1](#) zeigt eine Restriktionskarte für das Plasmid p200, das verwendet wird, um pLamBIGF zu produzieren, ein Zwischenplasmid in der Herstellung von pLBIGFTsc, das verwendet wird, um pBKIGF-2 herzustellen, ein Zwischenplasmid in der Herstellung eines Expressionsvektors, der für IGF-I kodiert, nämlich pBKIGF-2B.

[0042] [Fig. 2](#) zeigt die Nucleotidsequenz des EcoRI-EcoRI-Fragments (von den Positionen 1149 bis 1633) von p200, das die MF- α -I-Präpro- und IGF-I-Gensequenzen enthält (Seq.-ID Nr. 1).

[0043] [Fig. 3](#) zeigt die Konstruktion von pLamBIGF aus drei Plasmidfragmenten und einem Stück synthetischer DNA (Seq.-ID Nr. 2 und 3). pLamBIGF ist ein Zwischenplasmid in der Herstellung von pLBIGFTsc, das verwendet wird, um pBKIGF-2 herzustellen.

[0044] [Fig. 4](#) zeigt die Konstruktion des Zwischenplasmids pLBIGFTsc aus pLamBIGF.

[0045] [Fig. 5](#) zeigt die Konstruktion des Zwischenplasmids pRanTsc, das in der Herstellung von pBKIGF-2 verwendet wird.

[0046] [Fig. 6](#) zeigt die Konstruktion von pBKIGF-2 aus pLS32Tsc, pLBIGFTsc, pLS33Tsc und pRanTsc.

[0047] [Fig. 7](#) zeigt die Konstruktion von pBKIGF-2A, das verwendet wird, um pBKIGF-2B herzustellen, aus pLBIGFTsc, pBKIGF-2 und einem Stück synthetischer DNA (Seq.-ID Nr. 4 und 5).

[0048] [Fig. 8](#) zeigt die Konstruktion von pLamBRan, das verwendet wird, um pBKIGF-2B herzustellen, aus pLS33LamB, pRANTES und einem Stück synthetischer DNA (Seq.-ID Nr. 6 und 7).

[0049] [Fig. 9](#) zeigt die Konstruktion des Expressionsvektors pBKIGF-2B aus pBKIGF-2, pBKIGF-2A, pLamBRan und einem Stück synthetischer DNA (Seq.-ID Nr. 8 und 9).

[0050] [Fig. 10](#) zeigt eine Serie von drei HPLC-Chromatogrammen, die die Evolution der IGF-I-Spezies während der Umfaltung zeigen (von links nach rechts, fehlgefalteter IGF-I, korrekt gefalteter IGF-I und reduzierter IGF-I). Diese Chromatogramme wurden zu Beginn der Faltung (unteres Chromatogramm), 1 Stunde nach Beginn der Faltung (mittleres Chromatogramm) und 3 Stunden nach Beginn der Faltung (oberes Chromatogramm) erstellt.

[0051] [Fig. 11](#) zeigt ein Phasendiagramm, das wässrige Zweiphasen-Systeme beschreibt, die durch Hinzufügen von Salz und Polymer zum Gesamtextrakt erzeugt wurden, der Harnstoff, DTT, nicht nativen IGF-I und zellassozierte Feststoffe enthält. Es werden Symbole verwendet, um Zweiphasen-Systeme (leere Kreise), Einphasen-Systeme (ausgefüllte Kreise), Zweiphasen-Systeme mit schwebenden Feststoffen (p) und dargestellte Binodalpunkte (X) zu markieren. Kurven werden verwendet, um die ungefähre Position des Binodals (durchgehend), der Grenze für die Feststoffsedimentierung (strichliert) und der Grenze des Phasenverhältnisses darzustellen, der ein geringeres Phasen-Containment der Feststoffe ermöglicht (punktirt). Die schraffierte Region zeigt die optimale Region für die Trennung von IGF-I und zellassozierten Feststoffen an.

[0052] [Fig. 12](#) zeigt die Wirkung der Kupferkonzentration auf die Kinetik der IGF-I-Umfaltung. Die Umfaltung wurde bei 25 °C mit Kupferchloridkonzentrationen in Spuren (Kreuz), 0,013 μ M (leerer Kreis), 0,052 μ M (aus-

gefüllter Kreis), 0,13 μM (leeres Quadrat), 0,52 μM (Sternchen), 1,3 μM (leeres Dreieck), 5,2 μM (ausgefülltes Dreieck) und 13 μM (ausgefülltes Quadrat) durchgeführt.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

A. Definitionen

[0053] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Polypeptid von Interesse“ im Allgemeinen auf Peptide und Proteine mit mehr als etwa 10 Aminosäuren. Die Polypeptide können homolog zu der Wirtszelle oder, vorzugsweise, exogen sein, was bedeutet, dass sie für die verwendete Wirtszelle heterolog, d.h. fremd, sind, wie z.B. ein menschliches Protein, das von einer Chinahamster-Eierstockzelle oder einer Bakterienzelle produziert wurde, oder ein Hefe-Polypeptid, das von einer anderen Hefe- oder einer Bakterien- oder Säugetierzelle produziert wurde. Vorzugsweise werden Säugetier-Polypeptide (Polypeptide, die ursprünglich von einem Säugetier-Organismus stammen) verwendet, noch bevorzugter jene, die in prokaryotischen Zellen hergestellt werden, noch bevorzugter als Einschlusskörper in Bakterienzellen, insbesondere aus dem Periplasma des Bakteriums.

[0054] Beispiele bakterieller Polypeptide umfassen z.B. alkalische Phosphatase und β -Lactamase. Beispiele an Säugetier-Polypeptiden umfassen Moleküle, wie z.B. Renin, ein Wachstumshormon, unter anderem das menschliche Wachstumshormon; das Rinder-Wachstumshormon; den wachstumshormonfreisetzenden Faktor; das Nebenschilddrüsenhormon; das schilddrüsenstimulierende Hormon; Lipoproteine; α 1-Antitrypsin; die Insulin-A-Kette; die Insulin-B-Kette; Proinsulin; das follikelstimulierende Hormon; Calcitonin; das Luteinisierungshormon; Glucagon; Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Faktor VIIIc, Faktor IX, den Gewebefaktor und den Wilbrand-Faktor; Anti-Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Protein C; den atrialen natriuretischen Faktor; Lungensurfaktant; einen Plasminogenaktivator, wie z.B. Urokinase oder den menschlichen Urin- oder Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA); Bombesin; Thrombin; den hämopoetischen Wachstumsfaktor; Tumornekrose-Faktor- α und β ; Enkephalinase; ein Serumalbumin, wie z.B. das menschliche Serumalbumin; die „Mullerian Inhibiting Substance“; die Relaxin-A-Kette; die Relaxin-B-Kette; Prorelaxin; gonadotropinassoziertes Maus-Peptid; ein mikrobielles Protein, wie z.B. β -Lactamase; Dnase; Inhibin; Activin; Gefäßendothelwachstumsfaktor; Rezeptoren für Hormone oder Wachstumsfaktoren; Integrin; Protein A oder D; rheumatoide Faktoren; einen neurotrophen Faktor, wie z.B. der aus Knochen gewonnene neurotrophe Faktor (BDNF), Neurotrophin-3, -4, -5 oder -6 (NT-3, NT-4, NT-5 oder NT-6), oder einen Nervenwachstumsfaktor, wie z.B. NGF- β ; den aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor (PDGF); den Fibroblastenwachstumsfaktor, wie z.B. aFGF und bFGF; den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF); den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF), wie z.B. TGF- α und TGF- β , unter anderem TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 oder TGF- β 5; den insulinähnlichen Wachstumsfaktor I und II (IGF-I und IGF-II); des(1-3)-IGF-I (Gehirn-IGF-I), Bindungsproteine des insulinähnlichen Wachstumsfaktors; CD-Proteine, wie z.B. CD-3, CD-4, CD-8 und CD-19; Erythropoietin; osteoinduktive Faktoren; immunotoxine; ein morphogenetisches Knochen-Protein (BMP); ein Interferon, wie z.B. Interferon- α , - β und - γ ; das Koloniewachstum stimulierende Faktoren (CSFs), z.B. M-CSF, GM-CSF und G-CSF; Interleukine (ILs), z.B. IL-1 bis IL-10; Superoxiddismutase; T-Zellen-Rezeptoren; Oberflächenmembranproteine; den Abbau beschleunigenden Faktor; ein virales Antigen, z.B. ein Teil der AIDS-Hülle; Transportproteine; Homing-Rezeptoren; Addressine; Regulationsproteine; Antikörper; sowie Fragmente beliebiger der oben genannten Polypeptide.

[0055] Die bevorzugten Polypeptide von Interesse sind jene, die leicht in prokaryotischen Zellen mit einem Minimum an Proteolyse herzustellen sind und für ihren gedachten Zweck nicht glykosyliert werden müssen. Beispiele solcher Säugetier-Polypeptide umfassen IGF-I, IGF-II, den Gehirn-IGF-I, das Wachstumshormon, Relaxin-Ketten, den wachstumshormonfreisetzenden Faktor, Insulin-Ketten oder Pro-Insulin, Urokinase, Immunotoxine, NGF, NT-5 und Antigene. Besonders bevorzugte Säugetier-Polypeptide umfassen IGF-I, den Gehirn-IGF-I, das Wachstumshormon und ein Neurotrophin, wie z.B. NGF, NT-3, NT-4, NT-5 und NT-6, unter anderem NT-5, und das am meisten bevorzugte Säugetier-Polypeptid ist IGF-I.

[0056] Wie hierin verwendet, bezieht sich „IGF-I“ auf den insulinähnlichen Wachstumsfaktor I aus einer beliebigen Spezies, unter anderem von Rindern, Schafen, Schweinen, Pferden und, vorzugsweise, Menschen, und zwar in nativer Sequenz oder in Form einer Variante oder rekombinant hergestellt. Ein Verfahren zur Herstellung von IGF-I wird in dem am 19. Dezember 1984 veröffentlichten EP 128.733 beschrieben.

[0057] Wie hierin verwendet, beschreibt der Begriff „in einer nicht nativen Konformation“ Polypeptide, die eine sekundäre, tertiäre und/oder quartäre Struktur annehmen, die nicht das native Äquivalent ist. Das Polypeptid kann zu jedem Zeitpunkt des hierin beanspruchten Prozesses solch eine Konformation aufweisen, egal ob vor dem Kontaktierungsschritt oder während oder nach dem Kontaktieren mit einem chaotropen Agens und pha-

senbildenden Spezies. Das Polypeptid in dieser nicht nativen Konformation kann löslich, jedoch in einer inaktiven Form vorliegen, oder es kann ein nicht natives Membran-Protein sein, oder es kann unlöslich sein und eine biologisch inaktive Konformation mit fehlgepaarten oder nicht ausgebildeten Disulfidbindungen aufweisen. Dieses unlösliche Polypeptid ist vorzugsweise, jedoch nicht notwendigerweise, in Refraktil-Körpern enthalten, d.h. es kann unter einem Phasenkontrast-Mikroskop sichtbar sein oder auch nicht.

[0058] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „inkorrekt gefaltete“ Polypeptide auf präzipitierte oder aggregierte Polypeptide, die in Refraktil-Körpern enthalten sind. „Nicht native“ Polypeptide werden aus „inkorrekt gefalteten“ Polypeptiden erhalten und umfassen korrekt gefaltetes und fehlgefaltetes Material.

[0059] Der Begriff „Einschlusskörper“ oder „Refraktil-Körper“ bezieht sich auf dichte intrazelluläre Massen aggregierter Polypeptide von Interesse, die einen signifikanten Teil des Gesamtzellproteins darstellen, inkludierend alle Zellkomponenten. In einigen Fällen, jedoch nicht in allen Fällen, können diese Polypeptid-Aggregate unter einem Phasenkontrast-Mikroskop bei bis zu 1000fachen Vergrößerungen erkannt werden, und zwar sichtbar als helle Punkte innerhalb der Abgrenzung der Zellen.

[0060] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Zellen“ auf eine beliebige Art Zellen; die Zellen, aus denen das Polypeptid von Interesse gewonnen wird, können unabhängig von ihrem Status mit den phasenbildenden Reagenzien und Umfaltungs-Reagenzien behandelt werden. Die Erfindung umfasst z.B. Zellen in Zellkultur (ganze Nährlösung, in der die Zellen unabhängig von dem Becken, in dem sie gezüchtet werden, nicht getrennt werden) sowie jene, die einer Homogenisierung oder Zentrifugierung unterzogen wurden. Der Begriff „Zellkultur“ bezieht sich nicht nur auf Säugetier-Zellkulturen, sondern auf Kulturen beliebiger Zellen, unter anderem prokaryotische und Hefe-Zellen.

[0061] Der Begriff „Konformer“ bezieht sich auf Polypeptide, die sich nur durch die intramolekulare Disulfidbindung unterscheiden. IGF-I z.B. ist 70 Aminosäuren lang und besitzt sechs Cystein-Reste, die intramolekulare Disulfidbindungen bilden. Das korrekte, aktive IGF-I-Konformer besitzt Disulfidbindungen zwischen den Aminosäure-Resten C6-C48, C47-C52 und C18-C61. Das andere Haupt-Polypeptid ist ein biologisch weniger aktives Konformer mit Disulfidbindungen zwischen den Aminosäure-Resten C6-C47, C48-C52 und C18-C61.

[0062] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Fermentationsgefäß“ auf einen Behälter oder eine andere Vorrichtung, in der das Züchten des prokaryotischen Wirts stattfindet, um das Polypeptid von Interesse zu produzieren. Die Fermentationsnährlösung oder das Fermentationsmedium ist das für die Zellen verwendete Zuchtmedium.

[0063] Wie hierin verwendet, bezieht sich „chaotropes Agens“ auf eine Verbindung, die, in einer geeigneten Konzentration in einer wässrigen Lösung, in der Lage ist, die räumliche Konfiguration oder Konformation von Polypeptiden durch Veränderungen an deren Oberfläche zu modifizieren, um das Polypeptid im wässrigen Medium löslich zu machen. Die Veränderungen können durch z.B. durch Verändern des Hydratationsstatus, der Lösungsumgebung oder der Lösungsmittel-Oberflächen-Wechselwirkung auftreten. Die Konzentration an chaotropem Agens besitzt einen direkten Einfluss auf seine Stärke und Wirksamkeit. Eine stark denaturierende chaotrope Lösung enthält ein chaotropes Agens in hohen -Konzentrationen, das, in Lösung, ein in der Lösung vorhandenes Polypeptid wirksam auffaltet. Die Auffaltung ist relativ umfassend, jedoch reversibel. Eine moderat denaturierende chaotrope Lösung enthält ein chaotropes Agens, das, in ausreichenden Konzentrationen in Lösung, eine partielle Auffaltung eines Polypeptids aus jeder beliebigen, verdrehten Konformation ermöglicht, die das Polypeptid durch in der Lösung lösliche Zwischenprodukte angenommen hat, und zwar in die räumliche Konformation, in der es sich während der Tätigkeit in seiner aktiven Form unter endogenen oder homologen physiologischen Bedingungen befindet. Beispiele für chaotrope Agenzien umfassen Guanidinhydrochlorid, Harnstoff und Hydroxide, wie z.B. Natrium- oder Kaliumhydroxid. Chaotrope Agenzien umfassen eine Kombination dieser Reagenzien, wie z.B. ein Gemisch einer Base mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid.

[0064] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Reduktionsmittel“ auf eine Verbindung, die, in einer geeigneten Konzentration in einer wässrigen Lösung, Sulfhydrylgruppen erhält, so dass die intra- oder intermolekulare Disulfidbindungen chemisch aufgeschlossen werden. Repräsentative Beispiele für geeignete Reduktionsmittel umfassen Dithiothreitol (DTT), Dithioerythrit (DTE), β -Mercaptoethanol (BME), Cystein, Cysteinamin, Thioglycolat, Glutathion und Natriumborhydrid.

[0065] Wie hierin verwendet, bezieht sich „phasenbildende Spezies“ oder „phasenbildende Reagenzien“ auf Moleküle, die, wenn sie zu einer wässrigen Lösung hinzugefügt werden, multiple Phasen bilden. Eine „wässrige“ Lösung ist eine, worin der Großteil der Lösung (d.h. mehr als etwa 50 %) Wasser ist. Daher ist z.B. 40 %

Ethanol, das etwa 60 % Wasser enthält, ein geeignetes Lösungsmittel für eine phasenbildende Spezies. Beispiele für phasenbildende Spezies umfassen Polymer-Polymer-Kombinationen, Lösungsmittel-Salz-Kombinationen, Polymer-Salz-Kombinationen und Polymer-Lösungsmittel-Kombinationen. Am meisten bevorzugt wird hierin die Polymer-Salz-Kombination.

[0066] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Biomasse-Feststoffe und Nucleinsäuren“ auf partikuläre (nicht aufgelöste) Feststoffe, die aus den Zellen oder der Zellkultur, in denen/der das Polypeptid hergestellt wird, resultieren (oder aus diesen/dieser stammen), sowie auf Nucleinsäuren (DNA, RNA). Dies würde alle Quellen außer der Solubilisierung und der Flüssigextraktionskomponenten-Addition umfassen. Solche Feststoffe umfassen z.B. Zellen, Zelltrümmer, Medienkomponenten, Zellmembranen und -vesikel sowie für die Zelle endogene Proteine, die keine löslichen Proteine sind, oder andere nicht lösliche Komponenten der Zelle. Bei der Durchführung des Verfahrens dieser Erfindung sind die Biomasse-Feststoffe und die Nucleinsäuren in einer entgegengesetzten Phase vom Polypeptid zu finden.

[0067] Wie hierin verwendet, beschreibt der Begriff „multipel“ in Bezug auf Phasen mehr als eine Phase, vorzugsweise zwei bis vier Phasen und insbesondere bevorzugt zwei Phasen. Eine Phase, die „an Polypeptid angereichert ist und an Biomasse-Feststoffen verarmt ist“, bezieht sich auf eine Phase, in der das Polypeptid einen Verteilungskoeffizienten von mehr als eins aufweist und die Biomasse-Feststoffe einen Verteilungskoeffizienten von weniger als eins besitzen, wobei der Verteilungskoeffizient einen Verweis auf die Phase von Interesse aufweist. Wenn z.B. die untere Phase eine Produktanreicherung aufweist, so ist der Verteilungskoeffizient die Konzentration in der unteren Phase dividiert durch die Konzentration in der oberen Phase.

[0068] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Osmolyt“ auf ein Agens, das der gepufferten Lösung Osmolalität verleiht oder die Hydratation oder die Oberflächenspannung beeinflusst. Beispiele umfassen Polyole und Zucker, z.B. Glycerin, Erythrit, Arabit, Sorbit, Mannit, Xylit, Mannisidomannit, Glykosylglycerin, Glukose, Fruktose, Saccharose, Trehalose und Isofluorosid; Polymere, wie z.B. Dextrane, Levane und Polyethylenglykol; sowie einige Aminosäuren und Derivate davon, z.B. Glycin, Alanin, β -Alanin, Prolin, Taurin, Betain, Octopin, Glutamat, Sarcosin, γ -Aminobuttersäure sowie Trimethylamin-N-oxid (TMAO), wie von Yancey et al., Science 217, 1214-1222 (1982), und Schein, Bio/Technology 8, 308-315 (1990), ausführlicher beschrieben.

[0069] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Puffer“ auf eine gepufferte Lösung, die Veränderungen des pH durch die Wirkung ihrer Säure-Basen-Konjugatkomponenten widersteht.

[0070] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Lösungsmittel“ auf Alkohole und polare aprotische Lösungsmittel. Der Begriff Alkohole wird dabei im Sinne der im Allgemeinen für Alkohol verwendeten Terminologie angewandt, vorzugsweise Alkohole mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, noch bevorzugter Methanol, Ethanol, Isopropanol, N-Propanol oder t-Butanol, sowie Glycerin, Propylenglykol, Ethylenglykol, Polypropylenglykol und Polyethylenglykol, und insbesondere bevorzugt Ethanol oder Isopropanol. Solche Alkohole sind Lösungsmittel, die, bei Hinzufügen zu einer wässrigen Lösung, die Hydrophobizität der Lösung durch Herabsetzen der Lösungspolarität erhöhen. Polare aprotische Lösungsmittel sind Moleküle, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), N-Methylpyrrolidon (NMP), Tetrahydrofuran (THF), Dioxan, Acetonitril etc., die anstelle des Alkohols oder zusätzlich zu diesem verwendet werden können.

[0071] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Erdalkali-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalz“ auf ein Salz, das ein Kation der Erdalkali- oder Alkalimetall-Elemente oder ein Ammonium-Kation sowie ein anorganisches oder organisches (kohlenwasserstoff-basiertes) Anion besitzt. Beispiele für solche Salze umfassen Natriumchlorid, Ammoniumchlorid, Natriumcitrat, Kaliumcitrat, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Natriumphosphat, Calciumphosphat, Ammoniumphosphat, Magnesiumphosphat, Kaliumphosphat, Natriumsulfat, Ammoniumsulfat, Kaliumsulfat, Magnesiumsulfat, Calciumsulfat etc. Hierin bevorzugte Salze sind Chloride oder Sulfate. Das hierin am meisten bevorzugte Salz ist Natriumchlorid.

[0072] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Kupfer- oder Mangansalz“ auf ein Salz von Kupfer oder Mangan mit einem beliebigen Anion, unter anderem organische Anionen, das für die Förderung der Oxidation von Cystein-Resten verantwortlich ist. Geeignete Anionen umfassen Sulfate und Chloride, wobei Kupferchlorid insbesondere bevorzugt ist. Das Kupfer oder Mangan kann exogen hinzugefügt werden oder ein Rest der Fermentation sein oder andernfalls bereits in der Lösung, die das Polypeptid von Interesse enthält, vorhanden sein.

B. Ausführungsarten der Erfindung

[0073] Die Erfindung hierin betrifft ein Verfahren zur Steigerung der Umfaltungs-Ausbeute von Polypeptiden aus zellulären Wirten unter Verwendung einer minimalen Menge an Kupfer- oder Mangansalz als Katalysator in einem Puffer. Dieser Puffer besitzt einen pH von etwa 7 bis 12, hauptsächlich von der Art des Polypeptids und des Reduktionsmittels abhängig, vorzugsweise von etwa 8 bis 11, noch bevorzugter einen pH von 8,5 bis 11 und insbesondere bevorzugt von 8,5 bis 10,5.

[0074] Ein entscheidender Bestandteil des Puffers ist ein alkoholisches oder polares aprotisches Lösungsmittel in einer Konzentration von etwa 5-40 Vol.-%, vorzugsweise 10 bis 30 Vol.-%, der Lösung, abhängig z.B. von der Art des Polypeptids und des Lösungsmittels sowie der Konzentration des chaotropen Agens. Dieses besitzt insbesondere bevorzugt eine Konzentration von etwa 20 Vol.-%.

[0075] Ein zweiter entscheidender Bestandteil dieses Puffers ist ein Erdalkali-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalz, das in einer Konzentration von etwa 0,2 bis 3 M, vorzugsweise 0,2 bis 2 M, vorhanden ist, abhängig hauptsächlich von der chaotropen Konzentration, der Lösungsmittelkonzentration und der Art des verwendeten Erdalkali-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalzes und Polypeptids. Wenn z.B. das Kation Natrium, Kalium oder Ammonium ist, so liegt die Konzentration bei etwa 0,5 bis 3 M, wenn das Kation jedoch Magnesium ist, so liegt die Konzentration bei etwa 0,2 bis 1 M.

[0076] Ein dritter entscheidender Bestandteil des Puffers ist eine wirksame Menge eines chaotropen Agens. Die Menge einer solchen chaotropen Substanz hängt hauptsächlich von der Konzentration des Erdalkali-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalzes, der Konzentration des Lösungsmittels, der spezifischen Art des verwendeten Erdalkali-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalzes, der spezifischen Art des verwendeten chaotropen Agens und der Art des Polypeptids sowie vom pH des Puffers ab, liegt jedoch im Allgemeinen in der Bandbreite von etwa 0,1 bis 9 M, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 6 M und insbesondere bevorzugt von etwa 1,5 bis 4 M. Bezüglich spezifischer chaotroper Substanzen wird vorzugsweise etwa 0,1 bis 2 M Guanidinhydrochlorid und vorzugsweise etwa 1-3 M, noch bevorzugter etwa 1-2,5 M und insbesondere bevorzugt etwa 2 M, Harnstoff verwendet.

[0077] Ein vierter entscheidender Bestandteil des Puffers ist eine wirksame Menge eines Übergangsmetallsalzes, das aus Kupfer- und Mangansalzen ausgewählt wurde, so dass es zu einer Oxidation und der daraus resultierenden Umfaltung kommt. Die Menge an Kupfer- oder Mangansalz hängt hauptsächlich von der Art des verwendeten Übergangsmetalls und Polypeptids sowie von der vorhandenen Sauerstoffmenge ab. Je niedriger der Anteil der Sauerstoff-Addition, desto höher die Menge an Kupfer- oder Mangansalz, die verwendet werden kann. Die Kupfer- oder Mangansalzkonzentration liegt typischerweise bei etwa 0,01 bis 15 µM, vorzugsweise etwa 0,01 bis 10 µM, noch bevorzugter bei etwa 0,01 bis 5 µM und insbesondere bevorzugt bei etwa 0,01 bis 0,5 µM. Die oben stehenden, bevorzugten Bandbreiten werden insbesondere für IGF-I bevorzugt. Wird die Konzentration über etwa 15 µM angehoben, so führt dies zu einem unerwarteten, dramatischen Rückgang der Ausbeute an korrekt gefaltetem Polypeptid. Am meisten wird es bevorzugt, wenn die Konzentration eines Kupfer- oder Mangansalzes bei etwa 0,5 µM liegt. Das Übergangsmetallsalz kann bereits im Puffer ohne Hinzufügung von exogenem Übergangsmetallsalz vorhanden sein, z.B. wenn es ein Rückstand von der Fermentation ist, oder es kann dem Puffer hinzugefügt werden oder beides.

[0078] Geeignete Wirtszellen für die Expression der DNA, die für das gewünschte Polypeptid kodiert, sind die prokaryotischen, Hefe- oder die höheren eukaryotischen Zellen. Für diesen Zweck geeignete Prokaryoten umfassen Bakterien, wie z.B. Archaeobakterien und Eubakterien. Bevorzugte Bakterien sind Eubakterien, wie z.B. gramnegative oder grampositive Organismen, z.B. Enterobacteriaceae, etwa *Escherichia*, z.B. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, z.B. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, z.B. *Serratia marcescans*, sowie *Shigella*; Bacilli, etwa *B. subtilis* und *B. licheniformis* (z.B. *B. licheniformis* 41 P, offenbart in DD 266.710, veröffentlicht am 12. April 1989); *Pseudomonas*, wie z.B. *P. aeruginosa*; *Streptomyces*; *Azotobacter*; *Rhizobia*; *Vitreoscilla*; sowie *Paracoccus*. Geeignete *E.-coli*-Wirte umfassen *E. coli* W3110 (ATCC 27.325), *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B und *E. coli* X1776 (ATCC 31.537). Diese Beispiele dienen der Veranschaulichung und stellen keine Einschränkung dar.

[0079] Mutantenzellen einer beliebigen Art der oben genannten Bakterien können auch verwendet werden. Es ist natürlich notwendig, die geeigneten Bakterien auszuwählen, wobei die Replizierbarkeit des Replikons in den Zellen eines Bakteriums in Betracht gezogen wird. *E.-coli*-, *Serratia*- oder *Salmonella*-Spezies können z.B. geeigneterweise als Wirt verwendet werden, wenn wohlbekanntes Plasmide, wie etwa pBR322, pBR325, pACYA177 oder pKN410, verwendet werden, um das Replikon zu versorgen.

[0080] Der E.-coli-Stamm W3110 ist ein bevorzugter Wirt oder Stammwirt, da er ein häufig verwendeter Wirts-Stamm für rekombinante DNA-Produktfermentationen ist. Die Wirtszelle sollte vorzugsweise minimale Mengen proteolytischer Enzyme sekretieren. So kann z.B. der Stamm W3110 modifiziert werden, um eine genetische Mutation in den für die Proteine kodierenden Genen durchzuführen, wobei Beispiele für solche Wirte E. coli W3110, Stamm 27C7 umfassen. Der vollständige Genotyp von 27C7 ist tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ompTΔ degP41 kan^r. Der Stamm 27C7 wurde am 30. Oktober 1991 bei der American Type Culture Collection unter der ATCC-Nr. 55.244 hinterlegt. Alternativ dazu kann der E.-coli-Stamm mit einer periplasmatischen Mutanten-Protease, offenbart im US-Patent Nr. 4.946.783, ausgegeben am 7. August 1990, verwendet werden. Alternativ dazu sind In-vitro-Verfahren des Klonierens, z.B. PCR oder andere Nucleinsäure-Polymerase-Reaktionen, geeignet.

[0081] Der Stamm W3110 z.B. kann modifiziert werden, so dass er eine genetische Mutation in den Genen ausführt, die für Proteine kodieren, die für den Wirt endogen sind, wobei Beispiele für solche Wirte den E.-coli-W3110-Stamm 1A2 umfassen, der den vollständigen Genotyp tonAΔ besitzt; den E.-coli-W3110-Stamm 9E4, der den vollständigen Genotyp tonAΔ ptr3 besitzt; den E.-coli-W3110-Stamm 27C7 (ATCC 55.244), der den vollständigen Genotyp tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ompTΔ degP41 kan^r besitzt; den E.-coli-W3110-Stamm 37D6, der den vollständigen Genotyp tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ompTΔ degP41 kan^r rbs7Δ ilvG besitzt; den E.-coli-W3110-Stamm 40B4, wobei es sich um den Stamm 37D6 mit einer nicht kanamycinresistenten degP-Deletionsmutation handelt; sowie einen E.-coli-Stamm mit periplasmatischer Mutanten-Protease, offenbart im US-Patent Nr. 4.946.783, ausgegeben am 7. August 1990.

[0082] Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben, wie z.B. fädige Pilze oder Hefe, geeignete Klonierungs- oder Expressionswirte für polypeptidkodierende Vektoren. *Saccharomyces cerevisiae*, oder gemeine Bäckerhefe, ist der am häufigsten verwendete unter den niederen eukaryotischen Wirtsorganismen. Es sind jedoch eine Reihe anderer Genera, Spezies und Stämme leicht erhältlich und hierin von Nutzen, wie z.B. *Schizosaccharomyces pombe* [Beach und Nurse, *Nature* 290, 140 (1981); EP 139.383, veröffentlicht am 2. Mai 1985]; *Kluyveromyces*-Wirte (US-Patent Nr. 4.943.529; Fleer et al., s.o.), wie z.B. *K. lactis* [MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 737 (1983)], *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., s.o.), *K. thermotolerans* und *K. marxianus*; *Yarrowia* [EP 402.226]; *Pichia pastoris* [EP 183.070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.* 28, 265-278 (1988)]; *Candida*; *Trichoderma reesia* [EP 244.234]; *Neurospora crassa* [Case et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5259-5263 (1979)]; *Schwannomyces*, wie z.B. *Schwannomyces occidentalis* [EP 394.538, veröffentlicht am 31. Oktober 1990]; sowie fädige Pilze, wie z.B. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* [WO 91/00357, veröffentlicht am 10. Jänner 1991], und *Aspergillus*-Wirte, wie z.B. *A. nidulans* [Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 284-289 (1983); Tilburn et al., *Gene* 26, 205-221 (1983); Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1470-1474 (1984)] und *A. niger* [Kelly und Hynes, *EMBO J.* 4, 475-479 (1985)].

[0083] Geeignete Wirtszellen, die für die Expression der DNA geeignet sind, die für das gewünschte Polypeptid kodiert, können ebenso aus mehrzelligen Organismen stammen. Solche Wirtszellen sind in der Lage, komplexe Verarbeitungs- und Glykosylierungs-Aktivitäten durchzuführen. Im Prinzip ist jede höhere eukaryotische Zellkultur geeignet, egal ob sie aus einer Vertebraten- oder Invertebratenkultur stammt. Beispiele für Invertebraten-Zellen umfassen Pflanzen- und Insektenzellen. Es wurden zahlreiche Baculovirus-Stämme und -Varianten und korrespondierende permissive Insekten-Wirtszellen aus Wirten, wie z.B. *Spodoptera frugiperda* (Raupe), *Aedes aegypti* (Stechmücke), *Aedes albopictus* (Stechmücke), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) und *Bombyx mori*, identifiziert. Siehe z.B. Luckow et al., *Bio/Technology* 6, 47-55 (1988); Miller et al., *Genetic Engineering*, Band 8, 277-279, J.K. Setlow (Hrsg.), Plenum Publishing (1986); und Maeda et al., *Nature* 315, 592-594 (1985). Eine Reihe viraler Stämme zur Transfektion sind öffentlich erhältlich, z.B. die L-1-Variante von *Autographa californica* NPV und der Bm-5-Stamm von *Bombyx mori* NPV, und diese Viren können gemäß der vorliegenden Erfindung als das hierin beschriebene Virus verwendet werden, insbesondere zur Transfektion von *Spodoptera frugiperda*-Zellen.

[0084] Pflanzenzellenkulturen von Baumwolle, Mais, Kartoffeln, Sojabohnen, Petunien, Tomaten und Tabak können als Wirte verwendet werden. Typischerweise werden Pflanzenzellen durch Inkubation mit gewissen Stämmen des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* transfiziert, das zuvor bereits manipuliert wurde, so dass es die DNA enthält, die für das gewünschte Polypeptid kodiert. Während der Inkubation der Pflanzenzellenkultur mit *A. tumefaciens* wird die für das gewünschte Polypeptid kodierende DNA in den Pflanzenzellenwirt transferiert, so dass dieser transfiziert wird und, unter geeigneten Bedingungen, die DNA exprimiert, die für das gewünschte Polypeptid kodiert. Zusätzlich sind Regulations- und Signalsequenzen, die mit Pflanzenzellen kompatibel sind, erhältlich, wie z.B. der Nopalinsynthase-Promotor und Polyadenylierungssignalsequenzen.

Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen. 1, 561 (1982). Zusätzlich dazu sind DNA-Segmente, die aus der stromauf gelegenen Region des T-DNA-780-Gens isoliert wurden, in der Lage, die Transkriptionsmengen von pflanzen-exprimierbaren Genen in rekombinante DNA enthaltendem Pflanzengewebe zu aktivieren oder zu erhöhen. EP 321.196, veröffentlicht am 21. Juni 1989.

[0085] Beispiele für nützliche Säugetier-Wirtszellenlinien sind: Affennieren-CV1-Linie, transformiert durch SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); menschliche Embryonieren-Linie (293- oder 293-Zellen, die für das Wachstum in einer Suspensionskultur subkloniert sind, Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 59 [1977]); Babyhamster-Nierenzellen (BHK, ATCC CCL 10); Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 [1980]); Maus-Sertoli-Zellen (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 [1980]); Affen-Nierenzellen (CV1 ATCC CCL 70); Nierenzellen afrikanischer grüner Meerkatzen (VERO-76, ATCC CRL-1587); menschliche Zervixkarzinom-Zellen (HELA, ATCC CCL 2); Hunde-Nierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Büffelratten-Leberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442); menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065); Mammatumor der Maus (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-Zellen (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383, 44-68 [1982]); MRC-5-Zellen; FS4-Zellen; sowie eine menschliche Hepatom-Linie (Hep G2).

[0086] Wirtszellen werden mit den oben beschriebenen Expressions- oder Klonierungsvektoren dieser Erfindung transfiziert und vorzugsweise transformiert und in herkömmlichen Nährstoffmedien gezüchtet, die, je nach Eignung, für die Induktion von Promotoren, die Auswahl von Transformanten oder die Amplifikation der Gene, die für die gewünschten Sequenzen kodieren, modifiziert wurden.

[0087] Transfektion bezieht sich auf die Aufnahme eines Expressionsvektors durch eine Wirtszelle, egal, ob tatsächlich kodierende Sequenzen exprimiert werden oder nicht. Dem Fachmann sind zahlreiche Transfektionsverfahren bekannt, z.B. CaPO₄ und Elektroporation. Eine erfolgreiche Transfektion wird im Allgemeinen erkannt, wenn ein beliebiges Indiz der Operation dieses Vektors innerhalb der Wirtszelle auftritt.

[0088] Transformation bedeutet das Einführen von DNA in einen Organismus, so dass die DNA entweder als ein extrachromosomales Element oder durch einen chromosomalen Integranten replizierbar ist. In Abhängigkeit von der verwendeten Wirtszelle wird die Transformation unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt, die für diese Zellen geeignet sind. Die Calciumbehandlung unter Verwendung von Calciumchlorid, wie in Abschnitt 1.82 von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), beschrieben, oder die Elektroporation werden im Allgemeinen für Prokaryoten oder andere Zellen verwendet, die substantielle Zellwandbarrieren enthalten. Eine Infektion mit Agrobacterium tumefaciens wird für die Transformation gewisser Pflanzenzellen verwendet, wie von Shaw et al., Gene 23, 315 (1983), und in WO 89/05859, veröffentlicht am 29. Juni 1989, beschrieben. Zusätzlich dazu können Pflanzen unter Verwendung einer Ultraschallbehandlung transformiert werden, wie in WO 91/00358, veröffentlicht am 10. Jänner 1991, beschrieben.

[0089] Für Säugetierzellen ohne solche Zellwände wird das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren von Graham und van der Eb, Virology 52, 456-457 (1978), bevorzugt. Allgemeine Aspekte von Säugetierzellen-Wirtssystem-Transformationen wurden von Axel im US-Patent Nr. 4.399.216, ausgegeben am 16. August 1983, beschrieben. Transformationen in Hefe werden typischerweise nach dem Verfahren von Van Solingen et al., J. Bact. 130, 946 (1977), und Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3829 (1979), durchgeführt. Es können jedoch auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen verwendet werden, wie z.B. durch nucleare Mikroinjektion, Elektroporation, bakterielle Protoplastenfusion mit intakten Zellen, oder Polykationen, z.B. Polybren, Polyornithin etc. Für verschiedene Verfahren zur Transformation von Säugetierzellen siehe Keown et al., Methods in Enzymology (1989), Keown et al., Methods in Enzymology, Band 185, 527-537 (1990), und Mansour et al., Nature 336, 348-352 (1988).

[0090] Falls prokaryotische Zellen verwendet werden, um das Polypeptid von Interesse gemäß dem Verfahren dieser Erfindung herzustellen, so werden diese in einem geeigneten Medium gezüchtet, in dem der Promotor konstitutiv oder künstlich induziert werden kann, wie im Allgemeinen z.B. von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989), beschrieben.

[0091] Beispiele für geeignete Medien sind unten stehend im Abschnitt der Beispiele angeführt.

[0092] Alle notwendigen Ergänzungen neben Kohlenstoff, Stickstoff und anorganischen Phosphatquellen können in geeigneten Konzentrationen auch inkludiert sein, die alleine oder als Gemisch mit anderen Ergänzungen oder Medien, wie z.B. einer komplexen Stickstoffquelle, eingeführt werden. Der pH des Mediums kann

ein beliebiger pH von etwa 5-9 sein, abhängig hauptsächlich vom Wirtsorganismus.

[0093] Wenn Säugetier-Wirtszellen verwendet werden, um das Polypeptid dieser Erfindung herzustellen, so können sie in einer Reihe an Medien gezüchtet werden. Im Handel erhältliche Medien, wie z.B. Hams F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) und Dulbeccos Modifiziertes Eagle-Medium ([DMEM], Sigma), sind für das Züchten von Wirtszellen geeignet. Zusätzlich kann ein beliebiges der in Ham und Wallace, Meth. Enz. 58, 44 (1979), Barnes und Sato, Anal. Biochem. 102, 255 (1980), US-Patent Nr. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; oder 4.560.655; WO 90/03430; WO 87/00195; US-Patent Re. 30.985; oder US-Patent Nr. 5.122.469 beschriebenen Medien als Kulturmedium für die Wirtszellen verwendet werden. Jedes dieser Medien kann, je nach Bedarf, mit Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (wie z.B. Insulin, Transferrin oder epidermalem Wachstumsfaktor), Salzen (wie z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat), Puffern (wie z.B. HEPES), Nucleosiden (wie z.B. Adenosin und Thymidin), Antibiotika (wie z.B. GentamycinTM-Wirkstoff), Spurenelementen (definiert als anorganische Verbindungen, die normalerweise in Endkonzentrationen im mikromolaren Bereich vorhanden sind) und Glukose oder einer äquivalenten Energiequelle ergänzt sein. Jegliche anderen notwendigen Ergänzungen können ebenso in geeigneten Konzentrationen, die dem Fachmann nach dem Stand der Technik bekannt wären, inkludiert sein. Die Kulturbedingungen, wie z.B. Temperatur, pH und dergleichen, sind jene, die zuvor bei der für die Expression ausgewählten Wirtszelle verwendet wurden, und sind dem Fachmann bekannt.

[0094] Im Allgemeinen sind Grundsätze, Arbeitsvorschriften und praktische Verfahren für die Maximierung der Produktivität von In-vitro-Säugetier-Zellkulturen in *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler (Hrsg.), IRL Press, Oxford University Press, Oxford (1991), zu finden.

[0095] Das oben genannte Verfahren kann unabhängig davon angewandt werden, ob das Polypeptid intrazellulär oder im periplasmatischen Raum ist. Die hierin angegebenen bevorzugten Bedingungen zur Isolierung eines Polypeptids sind besonders auf Einschlusskörper gerichtet, die sich im periplasmatischen Raum befinden.

[0096] Es wird oftmals bevorzugt, das Polypeptid von Interesse von rekombinanten Zellproteinen oder Polypeptiden zu reinigen, um Präparate zu erhalten, die im Wesentlichen homogen zum Polypeptid von Interesse vor der Umfaltung sind. In einer Ausführungsform wird das Kulturmedium oder Lysat als ein erster Schritt zentrifugiert, um partikelförmige Zelltrümmer zu entfernen. Die Membran und die löslichen Proteinfractionen können danach, wenn notwendig, getrennt werden. Anschließend kann das Polypeptid, in Abhängigkeit davon, ob das Polypeptid membrangebunden oder löslich ist oder in einer aggregierten Form vorhanden ist, von der löslichen Proteinfraction und von der Membranfraction des Kulturlysats gereinigt werden. Danach wird das Polypeptid solubilisiert und anschließend unter Verwendung eines geeigneten Puffers umgefaltet. Die Details für dieses erste Isolierungsverfahren sind unten stehend beschrieben.

[0097] Unlösliches, nicht natives Polypeptid wird aus den prokaryotischen Wirtszellen in einem geeigneten Isolierungspuffer durch ein beliebiges, geeignetes Isolierungsverfahren isoliert, z.B. eines, das das Aussetzen der Zellen gegenüber einem Puffer mit geeigneter Ionenstärke involviert, um die meisten Wirtsproteine zu solubilisieren, in dem jedoch das aggregierte Polypeptid im Wesentlichen unlöslich ist, wodurch die Zellen aufgeschlossen werden, um die Einschlusskörper freizusetzen und sie z.B. durch Zentrifugierung zur Gewinnung verfügbar zu machen. Dieses Verfahren ist wohlbekannt und wird z.B. im US-Patent Nr. 4.511.503 beschrieben.

[0098] Kurz gesagt werden die Zellen im Puffer suspendiert (typischerweise bei einem pH von 5 bis 9, vorzugsweise von etwa 6 bis 8, unter Verwendung einer Ionenstärke von etwa 0,01 bis 2 M, vorzugsweise 0,1 bis 0,2 M). Jedes geeignete Salz, unter anderem Natriumchlorid, ist von Nutzen, um einen ausreichenden Ionenstärke-Wert beizubehalten. Die Zellen werden anschließend, während sie in diesem Puffer suspendiert sind, durch Lyse unter Verwendung von häufig angewandten Verfahren aufgeschlossen, z.B. mechanischer Verfahren, etwa einer Manton-Gaulin-Pressen, einer French-Pressen oder eines Schall-Oszillators, oder durch chemische oder enzymatische Verfahren.

[0099] Beispiele für chemische oder enzymatische Methoden des Zellaufschlusses umfassen das Spheroblasting, das die Verwendung von Lysozym zur Lyse der bakteriellen Wand umfasst [Neu et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17, 215 (1964)], und den osmotischen Schock, der die Behandlung lebensfähiger Zellen mit einer Lösung hoher Tonizität und mit einer Kaltwasser-Waschung geringer Tonizität umfasst, um die Polypeptide freizusetzen [Neu et al., *J. Biol. Chem.* 240, 3685-3692 (1965)]. Ein drittes Verfahren, beschrieben im US-Patent Nr. 4.680.262, ausgegeben am 14. Juli 1987, umfasst das Kontaktieren der transformierten bakte-

riellen Zellen mit einer wirksamen Menge eines niedrigeren Alkanols mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen für eine gewisse Zeit und bei einer Temperatur, die ausreicht, um die Zellen abzutöten und zu lysieren.

[0100] Nachdem die Zellen aufgeschlossen wurden, wird die Suspension typischerweise zentrifugiert, um die Einschlusskörper zu pelletieren. In einer Ausführungsform wird dieser Schritt bei etwa 500 bis 15.000 × g, vorzugsweise etwa 12.000 × g, in einer Standard-Zentrifuge durchgeführt, und zwar für eine ausreichende Zeitspanne, die vom Volumen und Zentrifugen-Design abhängt, normalerweise etwa 10 Minuten bis 0,5 Stunden. Das resultierende Pellet enthält im Wesentlichen die ganze unlösliche Polypeptidfraktion, ist der Zellaufschlussprozess jedoch nicht abgeschlossen, so kann es auch intakte Zellen oder gebrochene Zellfragmente enthalten. Die Vollständigkeit des Zellaufschlusses kann durch Resuspendieren des Pellets in einer kleinen Menge derselben Pufferlösung und Untersuchen der Suspension mit einem Phasenkontrast-Mikroskop getestet werden. Die Gegenwart gebrochener Zellfragmente oder ganzer Zellen deutet darauf hin, dass ein zusätzlicher Aufschluss notwendig ist, um die Fragmente oder Zellen und die assoziierten, nicht refraktilen Polypeptide zu entfernen. Nach einem weiteren solchen Aufschluss, falls erforderlich, wird die Suspension erneut zentrifugiert, und das Pellet wird gewonnen, resuspendiert und analysiert. Das Verfahren wird wiederholt, bis die visuelle Untersuchung die Abwesenheit gebrochener Zellfragmente in dem pelletierten Material ergibt oder bis es einer weiteren Behandlung nicht mehr gelingt, die Größe des resultierenden Pellets zu reduzieren.

[0101] In einer alternativen Ausführungsform wird das Polypeptid von Interesse, vorzugsweise exogen, durch Solubilisierung in einem geeigneten Puffer isoliert. Dieses Verfahren kann eine In-situ-Solubilisierung sein, die das direkte Hinzufügen von Reagenzien in das Fermentationsgefäß umfasst, nachdem das Polypeptid rekombinant produziert wurde, wodurch zusätzliche Schritte des Erntens, der Homogenisierung und der Zentrifugierung zum Erhalt des Polypeptids vermieden werden. Die verbleibenden Partikel können mittels Zentrifugierung oder Filtrierung oder Kombinationen davon entfernt werden. Alternativ dazu, und auch bevorzugter, kann ein Mehrfach-Phasen-Isolations-/Extraktions-System zur Reinigung von Polypeptiden von den verbleibenden Partikeln verwendet werden.

[0102] In dem wässrigen Mehrfach-Phasen-Isolations-System wird/werden ein oder mehrere Denaturierungsmittel (chaotropes Agens), wie z.B. Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid und/oder eine Base, und ein Reduktionsmittel, wie z.B. Dithiothreitol oder Cystein, zu dem polypeptidhaltigen Medium mit basischem pH hinzugefügt, und es werden anschließend phasenbildende Spezies zu der Nährlösung hinzugefügt. Ist einmal diese zweite Gruppe an Reagenzien zu der Nährlösung hinzugefügt worden, so bilden sich multiple Phasen, wobei eine Phase an Polypeptid angereichert und an Biomasse-Feststoffen und Nucleinsäuren verarmt ist. Das System besitzt vorzugsweise zwei bis vier Phasen und noch bevorzugter zwei Phasen, wobei eine an Polypeptid angereichert ist und die andere an Biomasse-Feststoffen und Nucleinsäuren angereichert ist. Das gewünschte Polypeptid teilt sich vorzugsweise zur oberen Phase hin, so dass die obere Phase an Polypeptid angereichert ist und an den Biomasse-Feststoffen und Nucleinsäuren verarmt ist.

[0103] Nachdem die Fermentation vollständig ist, wird daher die Zellkultur mit einem oder mehreren chaotropen Agenzien, gegebenenfalls einem Reduktionsmittel, und phasenbildenden Reagenzien kontaktiert, so dass sich multiple Phasen bilden, von denen eine an Polypeptid von Interesse angereichert ist. Es wird bevorzugt, das chaotrope Agens und Reduktionsmittel zuerst hinzuzufügen, um das Polypeptid aus der Zelle zu extrahieren und seine Solubilität in der Nährlösung zu erhalten, bevor die phasenbildenden Reagenzien hinzugefügt werden. Während das Polypeptid von Interesse aus jeder Phase extrahiert werden kann (und in jeder angereichert werden kann), wird es auch vorzugsweise aus der oberen Phase gewonnen.

[0104] Am meisten wird es bevorzugt, wenn das chaotrope Agens und gegebenenfalls das Reduktionsmittel direkt zu der Fermentationsnährlösung im Fermentationsgefäß hinzugefügt werden, vor der Isolierung des Polypeptids, so dass die Reagenzien die Zellen durchdringen und das Polypeptid solubilisiert wird und zum umgebenden Medium diffundiert.

[0105] Beispiele für geeignete Reduktionsmittel Agenzien umfassen Dithiothreitol (DTT), β-Mercaptoethanol (BME), Cystein, Thioglycolat und Natriumborhydrid. Die Menge an Reduktionsmittel, das im Puffer vorhanden sein soll, hängt hauptsächlich von der Art des Reduktionsmittels und des chaotropen Agens, dem Typ und dem pH des verwendeten Puffers und dem Typ und der Konzentration des Polypeptids im Puffer ab. Eine wirksame Menge an Reduktionsmittel ist eine, die ausreicht, um die intermolekulare disulfidvermittelte Aggregation zu eliminieren. Mit 0,5-6 mg/ml IGF-I in einer gepufferten Lösung mit einem pH von 7,5-10,5 z.B., enthaltend 1-4 M Harnstoff, liegt die DTT-Konzentration bei etwa 1-20 mM, und die Konzentration an Cystein liegt bei etwa 10-50 mM. Das bevorzugte Reduktionsmittel ist DTT bei etwa 2-10 mM oder Cystein bei etwa 30-50 mM.

[0106] Für die Durchführung dieser Erfindung geeignete chaotrope Agenzien umfassen z.B. Harnstoff und Salze von Guanidin oder Thiocyanat, noch bevorzugter Harnstoff, Guanidinhydrochlorid oder Natriumthiocyanat. Die Menge des notwendigen chaotropen Agens, das im Puffer vorhanden sein muss, hängt z.B. vom Typ des vorhandenen chaotropen Agens und vom vorhandenen Polypeptid ab. Die Menge des chaotropen Agens, das zu der Fermentationsnährlösung hinzuzufügen ist, ist ausreichend groß, um das Polypeptid aus der Zelle zu extrahieren und um seine Solubilität in der Nährlösung zu bewahren. Falls das Polypeptid aus der oberen Phase extrahiert werden soll, so muss die Menge des chaotropen Agens ausreichend gering sein, so dass die Dichte nach der Addition der phasenbildenden Spezies nicht in einem Ausmaß erhöht wird, so dass die Feststoffe an die Oberfläche steigen, anstatt sich am Boden abzusetzen. Im Allgemeinen liegt die Konzentration des chaotropen Agens bei etwa 0,1 bis 9 M, vorzugsweise etwa bei 0,5-9 M, noch bevorzugter bei etwa 0,5 bis 6 M und insbesondere bevorzugt bei etwa 0,5-3 M. Das chaotrope Agens wird vorzugsweise auch zum Kulturmedium hinzugefügt, bevor die phasenbildenden Reagenzien zugegeben werden. Das hierin bevorzugte chaotrope Agens ist Harnstoff mit etwa 1,5-2,5 M, noch bevorzugter etwa 2 M, oder Guanidin-Hydrochlorid mit etwa 0,5-3 M. Am meisten wird es bevorzugt, wenn das chaotrope Agens Harnstoff ist.

[0107] Die Konzentration des Polypeptids in der wässrigen Lösung, zu der das chaotrope Mittel und das Reduktionsmittel hinzugefügt werden, muss so sein, dass das Polypeptid in maximaler Ausbeute gewonnen wird. Die genaue Menge, die zu verwenden ist, hängt z.B. von der Art des Polypeptids und den Konzentrationen und Typen der anderen Bestandteile in der wässrigen Lösung ab, insbesondere des Reduktionsmittels, des chaotropen Agens, der phasenbildenden Spezies und des pH. Für Polypeptide im Allgemeinen liegt die bevorzugte Konzentration des Polypeptids bei etwa 0,1 bis 15 mg/ml. Die bevorzugte Konzentration an IGF-I (die zu der maximalen Ausbeute an denaturiertem oder nicht nativem IGF-I führt) liegt in der Bandbreite von 0,5-6 mg pro ml, noch bevorzugter 1,5-5 mg/ml.

[0108] Die Arten der phasenbildenden Spezies, die hierin zu verwenden sind, hängen von vielen Faktoren ab, unter anderem von der Art des Polypeptids und den Bestandteilen in der Fermentationsnährlösung, die behandelt wird. Die Spezies muss so ausgewählt werden, dass das Polypeptid nicht präzipitiert und eine Phase stärker hydrophob als die andere Phase ist, so dass sich das Polypeptid in der stärker hydrophoben Phase befindet und die Biomasse-Feststoffe und Nucleinsäuren sich in die weniger hydrophobe Phase begeben.

[0109] Die phasenbildenden Spezies können eine Kombination an Agenzien sein, inkludierend unter anderem Polymerkombinationen (Polymer-Polymer), Polymer-Salz-Kombinationen, Lösungsmittel-Salz- und Polymer-Lösungsmittel-Kombinationen. Geeignete Polymere sind sowohl hochgradig hydrophile Polymere als auch weniger hydrophile Polymere, d.h. alle phasenbildenden Polymere, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Beispiele umfassen Polyethylenglykol oder Derivate davon, inkludierend verschiedene molekulare Gewichte von PEG, wie z.B. PEG 4000, PEG 6000 und PEG 8000, Derivate von PEG, die z.B. in Grunfeld et al., s.o., beschrieben sind, Polyvinylpyrrolidon (PVP), in einer bevorzugten Molekulargewichtsbandbreite von etwa 36.000 bis 360.000, Stärken, wie etwa Dextran (z.B. Dextran 70 und 500), Dextrine und Maltodextrine (bevorzugtes Molekulargewicht zwischen etwa 600 und 5.000), Saccharose und Ficoll-400™-Polymer (ein Copolymer von Saccharose und Epichlorhydrin). Das hierin bevorzugte Polymer ist Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyvinylpyrrolidon oder ein Polysaccharid, wie z.B. ein Dextran. Das hierin am meisten bevorzugte Polymer ist PEG mit verschiedenen Molekulargewichten oder ein(e) PEG-Polypropylenglykol-Kombination oder -Copolymer.

[0110] Beispiele für geeignete organische Lösungsmittel umfassen Ethylenglykol, Glycerin, Dimethylsulfoxid, Polyvinylalcohol, Dimethylformamid, Dioxan und Alkohole, wie z.B. Methanol, Ethanol und 2-Propanol. Diese Lösungsmittel sind solche, die, wenn sie zu wässriger Lösung hinzugefügt werden, die Hydrophobizität der Lösung erhöhen.

[0111] Die Salze können anorganisch oder organisch sein und präzipitieren das Polypeptid vorzugsweise nicht. Salze, die Übergangselemente enthalten, werden nicht bevorzugt, da sie dazu tendieren, das Polypeptid zu präzipitieren. Es werden Anionen ausgewählt, die das Potential zur Bildung wässriger Mehrfach-Phasen-Systeme haben. Beispiele umfassen Ammoniumsulfat, zweibasisches Natriumphosphat, Natriumsulfat, Ammoniumphosphat, Kaliumcitrat, Magnesiumphosphat, Natriumphosphat, Calciumphosphat, Kaliumphosphat, Kaliumsulfat, Magnesiumsulfat, Calciumsulfat, Natriumcitrat, Mangansulfat, Manganphosphat etc. Arten an Salz, die für die Bildung von zweiphasigen wässrigen Systemen von Nutzen sind, werden ausführlicher von Zaslavskii et al., J. Chrom., s.o., evaluiert. Hierin bevorzugte Salze sind Sulfate, Phosphate oder Citrate sowie Alkali- oder Erdalkalimetalle. Noch weiter bevorzugt sind Sulfate und Citrate, und insbesondere bevorzugt sind Sulfate, da es weniger pH-Einschränkungen bei Sulfaten gibt. Die hierin am meisten bevorzugten Salze sind Natriumsulfat und Natriumcitrat.

[0112] Die Mengen der phasenbildenden Spezies, die zum Polypeptid von Interesse hinzuzufügen sind, um ein zufrieden stellendes Mehrfach-Phasen-System zu erhalten, sind jene, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Die Menge der phasenbildenden Spezies, die zum Polypeptid hinzugefügt wird, hängt von Faktoren wie z.B. der Menge an chaotropem Agens und Reduktionsmittel ab, die, falls überhaupt, bereits in der Fermentationsnährlösung vorhanden ist, von der Art der Zellkulturmedien, vom Typ der Zellen, die in der Fermentation verwendet wurden, vom Typ des behandelten Polypeptids, davon, ob das Polypeptid aus der unteren oder der oberen Phase gewonnen wird, und von dem/den Typ(en) der hinzugefügten, phasenbildenden Spezies. Die verwendete allgemeine Konzentration des Polymers liegt bei von etwa 5 Gew.-% bis zur Löslichkeitsgrenze für das Polymer, und die verwendete Salzkonzentration liegt bei von etwa 3 Gew.-% bis zur Löslichkeitsgrenze des Salzes, in Abhängigkeit von der Größe des benötigten Phasen-Volumen-Verhältnisses. Das Phasen-Volumen-Verhältnis muss ausreichend sein, um die Biomasse-Feststoffe aufzunehmen. Die Arten und Mengen der phasenbildenden Spezies, die wirksam sind, können mittels Phasendiagrammen bestimmt werden sowie durch Evaluierung des Endresultats, d.h. des Reinheitsgrads und der Ausbeute des Polypeptids von Interesse. Falls die phasenbildenden Spezies eine Polymer-Salz-Kombination sind, so liegt die Konzentration an hinzugefügtem Salz vorzugsweise bei etwa 4-15 Gew.-%, und die Konzentration des Polymers liegt bei 5-18 Gew.-%, so dass das gewünschte Polypeptid sich in einer entgegengesetzten Phase von jener befindet, in der die Biomasse-Feststoffe und die Nucleinsäuren vorhanden sind.

[0113] Falls das gewünschte System eines ist, in dem das Polypeptid in der oberen Phase verteilt ist und die Biomasse-Feststoffe und Nucleinsäuren in der unteren Phase zu finden sind, so gibt es ein Fenster an Konzentrationen phasenbildender Spezies. Werden größere Mengen an chaotropem Agens hinzugefügt, um die Solubilisierung beizubehalten, so ist die Menge der erforderlichen phasenbildenden Spezies umso größer. Eine hohe Konzentration aller dieser Reagenzien erhöht jedoch die Dichte der Lösung. Eine hohe Dichte führt zu einer weniger schnellen Absetzung der Biomasse-Feststoffe. Eine übermäßig große Dichte führt dazu, dass die Biomasse-Feststoffe an der Oberfläche schwimmen. Daher müssen die Konzentrationen an chaotropem Agens und phasenbildenden Spezies ausreichend hoch sein, um ein vollständig solubilisiertes Polypeptid zu erhalten, jedoch niedrig genug, um ein Sedimentieren der Biomasse-Feststoffe und Nucleinsäuren in die entgegengesetzte (untere) Phase zu ermöglichen.

[0114] Falls das Polypeptid in der oberen Phase gewonnen werden soll, so liegt die Salzkonzentration typischerweise bei etwa 4-7 Gew.-% und die Polymerkonzentration bei etwa 12-18 Gew.-%, abhängig z.B. von der Art des Salzes, Polymers und Polypeptids. Falls ein organisches Lösungsmittel als eine phasenbildende Spezies hinzugefügt wird, wie z.B. Ethanol, so wird es vorzugsweise in einer Menge von etwa 10 bis 30 Vol.-% der Lösung hinzugefügt, abhängig z.B. von der Art des Polypeptids und des Alkohols und, falls eine beliebige andere phasenbildende Spezies vorhanden ist, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 20 Vol.-%.

[0115] Die genauen Bedingungen zum Kontaktieren der Zellkultur mit den verschiedenen Reagenzien hängt z.B. vom pH des Puffers, den Arten der phasenbildenden Reagenzien und den Arten und Konzentrationen des Polypeptids und der chaotropen Mittel und Reduktionsmittel ab. Die Reaktionstemperatur liegt im Allgemeinen bei etwa 20-40 °C, noch bevorzugter liegt sie bei Raumtemperatur. Im Allgemeinen wird der Schritt des Kontaktierens für eine Zeitspanne von zumindest etwa 30 Minuten, vorzugsweise von etwa 30 Minuten bis 12 Stunden, durchgeführt, in Abhängigkeit davon, ob es zu Nebenreaktionen kommt, noch bevorzugter von etwa 30 Minuten bis 8 Stunden und insbesondere bevorzugt von etwa 30 Minuten bis 1,5 Stunden.

[0116] Falls das Polypeptid aufgefaltet wird, so wird das Ausmaß der Auffaltung in geeignetem Ausmaß durch Chromatographie des nicht nativen Polypeptids bestimmt, inkludierend eine hydrophobe Wechselwirkungs-chromatographie oder Ionenaustauschchromatographie. Ein ansteigender Peak-Bereich des nicht nativen Materials deutet darauf hin, wie viel nicht natives Polypeptid vorhanden ist.

[0117] Ist das Mehrfach-Phasen-System einmal aufgebaut, so ist eine Phase an Polypeptid angereichert und an den zerstörten Partikeln und Zellen, die die Biomasse-Feststoffe und Nucleinsäuren umfassen, verarmt. In einem Zwei-Phasen-System ist vorzugsweise die obere Phase an Polypeptid angereichert, wohingegen die untere Phase an zerstörten Partikeln und Zellen angereichert ist. Das Polypeptid kann leicht durch Trennung der Phasen gewonnen werden. Dieser Gewinnungsschritt kann durch Dekantieren der oberen Phase, durch Ablassen der unteren Phase oder durch Zentrifugieren erreicht werden. Das Polypeptid kann anschließend durch Veränderung des pH der Phase aus der Phase, in der es enthalten ist, isoliert werden, um das Polypeptid zu präzipitieren, oder durch Hinzufügen eines geeigneten Lösungsmittels, wonach das präzipitierte Polypeptid geeigneterweise mittels Zentrifugierung oder Filtration oder als Aufschlammung gewonnen wird. Alternativ dazu kann das Polypeptid aus der polymerhaltigen Phase durch erneute Extraktion durch Hinzufügen eines geeigneten Polymers, Salzes oder Lösungsmittels gewonnen werden. Im Fall von IGF-I wird das Polypeptid

aus der isolierten Polymerphase durch Absenken des pH gewonnen, so dass der IGF-I präzipitiert, was zu einer Ausbeute von IGF-I führt, die genauso hoch oder höher als etwa 97 % ist.

[0118] Ist es einmal aus der flüssigen Phase des Mehrfach-Phasen-Systems oder zu einem späteren Zeitpunkt der Reinigung erhalten worden, so wird das Polypeptid unter Verwendung der hierin beschriebenen Erfindung auf geeignete Art und Weise in eine aktive Konformation umgefaltet.

[0119] Falls sich das Polypeptid nicht schon in löslicher Form befindet, bevor es umgefaltet werden soll, so kann es durch Inkubation in einem alkalischen Puffer, der ein chaotropes Agens und ein Reduktionsmittel in Mengen umfasst, die notwendig sind, um das Polypeptid im Wesentlichen zu solubilisieren, solubilisiert werden. Diese Inkubation findet unter Bedingungen der Polypeptidkonzentration, der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur statt, die eine Solubilisierung des Polypeptids im alkalischen Puffer ermöglichen.

[0120] Die Messung des Ausmaßes der Solubilisierung des Polypeptids im Puffer wird geeignetermaßen mittels Trübheitsbestimmung, mittels Analyse der Polypeptidfraktionierung zwischen dem Überstand und dem Pellet nach der Zentrifugierung auf reduziertem SDS-Gel, mittels Protein-Test (z.B. dem Bio-Rad-Protein-Testset) oder mittels HPLC durchgeführt.

[0121] Der pH-Bereich des alkalischen Puffers zur Solubilisierung liegt typischerweise bei zumindest etwa 7,5, wobei der bevorzugte Bereich etwa 8-11 ist. Beispiele für geeignete Puffer, die einen pH innerhalb dieses letzteren Bereichs bereitstellen, umfassen Glycin, CAPSO (3-[Cyclohexylamino]-2-hydroxy-1-propansulfonsäure), AMP (2-Amino-2-methyl-1-propanol), CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure), CHES (2-[N-Cyclohexylamino]ethansulfonsäure) und TRIS-HCl (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)hydrochlorid. Der hierin bevorzugte Puffer ist Glycin oder CAPSO, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 20 mM, mit einem pH von etwa 8,5 bis 11, vorzugsweise etwa 10-11.

[0122] Die Konzentration des Polypeptids in der gepufferten Lösung zur Solubilisierung muss so sein, dass das Polypeptid im Wesentlichen solubilisiert oder partiell oder vollständig reduziert und denaturiert wird. Alternativ dazu kann das Polypeptid anfangs unlöslich sein. Die genaue Menge, die zu verwenden ist, hängt z.B. von den Konzentrationen und Arten anderer Bestandteile in der gepufferten Lösung ab, besonders von der Art des verwendeten Polypeptids, von der Art und der Menge des Reduktionsmittels, von der Art und der Menge des chaotropen Agens und dem pH des Puffers. Die Konzentration von IGF-I kann z.B. zumindest dreifach erhöht werden, wenn die Konzentration des Reduktionsmittels, z.B. DTT, gleichzeitig erhöht wird, um ein Verhältnis von DTT:IGF-I von etwa 3:1 bis 10:1 zu erhalten. Es ist wünschenswert, eine konzentriertere, solubilisierte Proteinlösung vor der Verdünnungsumfaltung zu produzieren. Daher liegt die bevorzugte Konzentration des Polypeptids bei zumindest etwa 30 mg/ml, mit einem bevorzugteren Bereich von 30-50 mg pro ml. IGF-I kann z.B. bis zu einer Konzentration von etwa 30-50 mg/ml in 2 M Harnstoff, 10 mM DTT solubilisiert werden und für die Faltung z.B. auf etwa 1 mg/ml verdünnt werden.

[0123] Nachdem das Polypeptid solubilisiert wurde, wird es im Puffer, enthaltend, wie oben beschrieben, das Lösungsmittel, das chaotrope Agens und Salze, platziert oder in diesen verdünnt. Der Puffer kann ein beliebiger der für die erste gepufferte Lösung oben aufgelisteten sein, wobei CAPSO, Glycin und CAPS mit einem pH von 8,5-11 bevorzugt sind, insbesondere in einer Konzentration von etwa 20 mM, und, insbesondere bevorzugt, CAPSO und Glycin. Das Polypeptid kann mit dem Umfaltungspuffer verdünnt werden, vorzugsweise zumindest fünffach, noch bevorzugter zumindest etwa zehnfach. Alternativ dazu kann das Polypeptid gegen den Umfaltungspuffer dialysiert werden. Das Umfalten wird typischerweise bei etwa 0-45 °C durchgeführt, vorzugsweise bei etwa 20-40 °C, noch bevorzugter bei etwa 23-37 °C, noch bevorzugter bei etwa 25-37 °C und insbesondere bevorzugt bei etwa 25 °C, und zwar für eine Zeitspanne von zumindest etwa einer Stunde. Die bevorzugte Temperatur wird nicht offensichtlich durch die Mengen an Salz, Lösungsmittel und chaotropem Agens beeinflusst, sie kann jedoch durch die Gegenwart von Saccharose und Glycerin beeinflusst werden, wobei sie in diesem Fall über etwa 20 °C gehalten werden sollte. Die Lösung enthält gegebenenfalls auch ein Reduktionsmittel und einen Osmolyten.

[0124] Das Reduktionsmittel wird geeigneterweise aus jenen, die oben stehend für den Solubilisierungsschritt beschrieben sind, in dem angegebenen Konzentrationsbereich ausgesucht. Seine Konzentration hängt besonders von den Konzentrationen des Erdalkalimetall-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalzes, des Polypeptids und des Lösungsmittels ab. Vorzugsweise liegt die Konzentration des Reduktionsmittels bei etwa 0,5 bis 8 mM, noch bevorzugter bei etwa 1-5 mM, noch bevorzugter bei etwa 0,5-2 mM. Die bevorzugten Reduktionsmittel sind DTT und Cystein.

[0125] Der gegebenenfalls verwendete Osmolyt ist vorzugsweise Saccharose (in einer Konzentration von etwa 0,25-1 M) oder Glycerin (in einer Konzentration von etwa 1-4 M). Noch bevorzugter liegt die Saccharosekonzentration bei etwa 1 M und die Glycerinkonzentration bei etwa 4 M.

[0126] Die anfängliche Konzentration des Polypeptids im Faltungspuffer ist so, dass das Verhältnis an gewonnenem, korrekt gefaltetem zu fehlgefaltetem Konformer maximiert wird, wie durch HPLC, RIA oder Biotest bestimmt. Die genaue Konzentration hängt z.B. von der Art des verwendeten Polypeptids ab. Die bevorzugte Konzentration des Polypeptids (die zu der maximalen Ausbeute des korrekt gefalteten Konformers führt) liegt im Bereich von etwa 0,1 bis 15 mg/ml, noch bevorzugter etwa 0,1 bis 6 mg/ml und insbesondere bevorzugt etwa 0,2 bis 5 mg/ml.

[0127] Zusätzlich dazu wird eine Sauerstoffquelle, wie z.B. Luft oder Sauerstoffgas, zu dem Puffer zugegeben oder auf andere Weise in diesen eingeführt, um die Oxidation zusammen mit dem Kupfer- oder Mangansalz durchzuführen. Der Sauerstoff kann in dem Puffer zu jedem beliebigen Zeitpunkt vorhanden sein, unter anderem vor der Zugabe des Polypeptids oder beliebiger anderer Reagenzien zu dem Puffer.

[0128] Die Menge der eingeführten Sauerstoffquelle hängt z.B. von der Art des verwendeten Gefäßes, der Art und Konzentration des Polypeptids, der Art der Sauerstoffquelle, der Art und Menge des Kupfer- oder Mangansalzes und der Art und Menge des vorhandenen Reduktionsmittels, falls vorhanden, ab sowie von der Art und der Menge des vorhandenen chaotropen Agens und vom pH des Puffes. Im Allgemeinen wird die Sauerstoffquelle durch passive Mittel eingeführt (z.B. als Luft im Kopfraum in einem Verhältnis von Kopfraum zu Flüssigkeitsvolumen von 2:1), und zwar unter Verwendung eines Rührers. Alternativ dazu kann die Sauerstoffquelle mittels Hindurchperlen durch einen Sprenger eingeführt werden. Die Einführungsrate des Sauerstoffs muss ausreichend sein, um es der Faltung zu ermöglichen, in vorzugsweise 1 bis 12 Stunden, noch bevorzugter etwa 1 bis 6 Stunden und insbesondere bevorzugt etwa 1 bis 3 Stunden, zur Vollendung zu gelangen. Die Hinzufügung von molarem Sauerstoff ist proportional zu der Konzentration des Reduktionsmittels und der Polypeptidkonzentration, jedoch umgekehrt proportional zu der Kupfer- oder Magnesiumsalz-Konzentration. Die Oxidationsrate ist durch die Menge des Katalysators, jedoch nicht durch die Sauerstoffadditionsrate eingeschränkt. Eine höhere Sprengungsrate ist für die Faltung eines größeren Volumens erforderlich.

[0129] Das Umfaltungsausmaß, das nach dieser zweiten Inkubation auftritt, wird auf geeignete Art und Weise durch den RIA-Titer des Polypeptids oder durch eine HPLC-Analyse, z.B. unter Verwendung einer Vydac- oder Baker-C-18-Säule, bestimmt, wobei ein ansteigender RIA-Titer oder die ansteigende Peak-Größe korrekt gefalteter Polypeptide in direkter Korrelation mit ansteigenden Mengen an korrekt gefaltetem, biologisch aktivem Polypeptid-Konformer steht, das im Puffer vorhanden ist. Die Inkubation wird durchgeführt, um die Ausbeute an korrekt gefaltetem Polypeptid-Konformer und das Verhältnis von gewonnenem, korrekt gefaltetem Polypeptid-Konformer zu fehlgefaltetem Polypeptid-Konformer zu maximieren, wie durch RIA oder HPLC bestimmt, und um die Ausbeute multimerer, assoziierter Polypeptide zu minimieren, wie durch die Stoffbilanz bestimmt.

[0130] Nachdem das Polypeptid umgefaltet wurde, sind die folgenden Verfahren als Beispiele für geeignete Reinigungsverfahren zum Erhalt größerer Reinheit zu sehen: Fraktionierung auf Immunaффinitäts- oder Ionenaustausch-Säulen; Ethanolpräzipitation; Umkehrphasen-HPLC; Hydrophob-Chromatographie; Chromatographie auf Silica oder auf einem Ionenaustauschharz, wie z.B. S-Sepharose und DEAE, Chromatofokussierung; SDS-PAGE; Ammoniumsulfatpräzipitation; und Gelfiltration, z.B. unter Verwendung von Sephadex G-75.

[0131] Die Erfindung ist durch Verweis auf die folgenden Beispiele, die zur Veranschaulichung der Erfindung dienen, besser verständlich gemacht.

Beispiel I

A. Konstruktion des Wirtszellen-Stamms 37D6

[0132] Der zur Produktion von rekombinantem, menschlichem IGF-I in der in diesem Beispiel beschriebenen Fermentation verwendete Wirt war ein Derivat von *E. coli* W3110, genannt 37D6. Der vollständige Genotyp von 37D6 ist tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δrbs7 ilvG Δ(argF-lac)169 ompTΔ degP41kan^r. Die Ableitung von Stamm 27C7, ein Mutterstamm von 37D6 mit dem Genotyp tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ompTΔ degP41 kan^r, wird in WO 93/11240, veröffentlicht am 10. Juni 1993, dargelegt, dessen Offenbarung hierin mittels Verweis aufgenommen ist. Stamm 27C7 wurde am 30. Oktober 1991 in der American Type Culture Collection unter der ATCC-Nr. 55.244 hinterlegt.

[0133] Stamm 37D6 ist derselbe wie der oben beschriebene Stamm 27C7, jedoch mit der Ausnahme, dass er eine rbs7-Deletion (Ribose-Verwendungsminus) und einen wiederhergestellten ilvG-Locus besitzt. Beide Marker können mittels P1-Transduktion eingeführt werden.

B. Beschreibung/Konstruktion des IGF-I-Expressionsplasmids pBKIGF2B

[0134] Im IGF-I-exprimierenden Plasmid pBKIGF-2B werden die Transkriptions- und Translationssequenzen, die für die Expression des IGF-I-Gens in *E. coli* erforderlich sind, durch den alkalische-Phosphatase-Promotor und die trp-Shine-Dalgarno-Sequenz bereitgestellt. Der λ -t₀-Transkriptionsterminator befindet sich neben dem IGF-I-Terminationscodon. Die Sekretion des Proteins aus dem Zytoplasma wird durch die lamB-Signalsequenz oder, alternativ dazu, durch die STII-Signalsequenz gesteuert.

[0135] Die Mehrheit an rhIGF-I ist im periplasmatischen Zellraum zu finden. Das Plasmid pBKIGF-2B verleiht dem transformierten Wirt eine Tetracyclin-Resistenz.

[0136] Das Plasmid pBKIGF-2B wurde in mehreren Schritten unter Verwendung von pLS32Tsc, pLBIGFTsc, pLS33Tsc und pRanTsc als Zwischenplasmide konstruiert.

Schritt 1: pLS32Tsc

[0137] Das Sekretionsplasmid pLS32Tsc enthält das IGF-I-Gen. Die Transkriptions- und Translationssequenzen, die für die Expression des IGF-I-Gens in *E. coli* erforderlich sind, werden durch den alkalische-Phosphatase-Promotor und die trp-Shine-Dalgarno-Sequenz bereitgestellt. Der λ -t₀-Transkriptionsterminator befindet sich neben dem IGF-I-Terminationscodon. Die Sekretion des Proteins aus dem Zytoplasma wird durch die lamB-Signalsequenz oder, alternativ dazu, durch die STII-Signalsequenz gesteuert. Die Mehrheit an rhIGF-I ist im periplasmatischen Zellraum zu finden. Das Plasmid pLS32Tsc verleiht dem transformierten Wirt eine Tetracyclin-Resistenz.

[0138] Das Plasmid pLS32Tsc wurde in mehreren Schritten unter Verwendung von pLS32, pAPlamB, pLS32lamB, pLS33lamB und pLS33Tsc als Zwischenplasmide konstruiert, wie ausführlich in WO 93/11240, s.o., beschrieben.

Schritt 2: pLBIGFTsc

Schritt a: pLamBIGF

[0139] Für den ersten Teil der Ligation wurde das EcoRI-PstI-Vektor-Fragment aus pRB322 isoliert. Für den zweiten Teil der Ligation wurde ein PstI-NcoI-1244-bp-Fragment aus pAPLamB isoliert. Für den dritten Teil der Ligation wurde das HaeIII-EcoRI-196-bp-Fragment, enthaltend das IGF-I-Gen, außer das anfängliche 5'-Ende, aus dem Plasmid p200 isoliert. p200 ist ein von pBR322 abstammendes Plasmid mit, in 5'- zu 3'-Richtung, dem Chelatin-Promotor, der MF- α -I-Präpro-Signalsequenz, der für reifen IGF-I kodierenden DNA und dem 2-Mikron-Terminator. Es enthält den ColE1-Replikationsstartpunkt für Bakterien und den 2-Mikron-Startpunkt für Hefe. [Fig. 1](#) stellt ein Restriktionsenzym-Plasmid-Diagramm von p200 dar. Die Nucleotidsequenz (Seq.-ID Nr. 1) des EcoRI-Fragments (beginnend bei Position 1149) bis EcoRI-Fragment (beginnend bei Position 1628) von p200, die das MF- α -I-Präpro- und das IGF-I-Gen enthält, ist in [Fig. 2](#) bereitgestellt. Die HaeIII- PstI-, BamHI- und Sall-Restriktionsstellen, die ebenso im Diagramm aus [Fig. 2](#) gezeigt werden, sind in der Sequenz durch Unterstreichen angezeigt. Es wurde ebenso ein Stück synthetischer DNA, das die Signalsequenz mit dem IGF-I-Gen verbindet (NcoI an HaeIII), hergestellt, und zwar mit folgender Sequenz:

5'-CATG GCC GGT CCG GAA ACT CTG TGC GGC GC (Seq.-ID Nr. 2)

3'- CGG CCA GGC CTT TGA GAC ACG C (Seq.-ID Nr. 3)

[0140] Die drei Plasmidfragmente und die synthetische DNA wurden aneinander ligiert, um pLamBIGF zu bilden, wie in [Fig. 3](#) dargestellt.

Schritt b: pLBIGFTsc

[0141] Das XbaI-BamHI-Vektor-Fragment wurde aus pLS18 als erstes Ligationsfragment isoliert. Der zweite Teil der Ligation bestand aus einem 412-bp-Stul-BamHI-Fragment aus dem oben beschriebenen Plasmid pdH108-4. Der dritte Teil der Ligation wurde durch einen EcoRI-Verdau von pLamBIGF, gefolgt von einer Be-

handlung mit dem DNA-Polymerase-Klenow-Fragment, gefolgt von einem XbaI-Verdau hergestellt. Das daraus resultierende 302-bp-Fragment wurde isoliert. Diese drei Fragmente wurden ligiert, um pLBIGFTsc zu ergeben, wie in [Fig. 4](#) dargestellt.

Schritt 3: pRanTsc

[0142] Das XbaI-BamHI-Vektor-Fragment wurde aus pLS18 als erstes Ligationsfragment isoliert. Der zweite Teil der Ligation bestand aus einem 412-bp-StuI-BamHI-Fragment aus dem oben beschriebenen Plasmid pdH108-4. Der dritte Teil der Ligation wurde aus pRANTES hergestellt. pRANTES ist ein auf pBR322 basierendes Plasmid, das ein Fragment eines XbaI-Linkers enthält, gefolgt von dem STII-Signal, gefolgt von der für RANTES kodierenden cDNA [publiziert von Schall et al., J. Immunol. 141, 1018 (1988)], gefolgt von dem BamHI-Linker. Das dritte Fragment wurde durch Verdau von pRANTES mit BamHI hergestellt, gefolgt durch eine Behandlung mit dem DNA-Polymerase-Klenow-Fragment, gefolgt durch einen XbaI-Verdau. Das daraus resultierende 303-bp-Fragment wurde isoliert. Diese drei Fragmente wurden ligiert, um pRanTsc zu ergeben, wie in [Fig. 5](#) dargestellt.

Schritt 4: pBKIGF-2

[0143] Wie in [Fig. 6](#) dargestellt, wurde das EcoRI-PstI-540-bp-Fragment, enthaltend den alkalische-Phosphatase-Promotor, die λ B-Signalsequenz und die für die ersten 15 Aminosäuren von IGF-I kodierende DNA, aus pLS32Tsc ausgeschnitten. Das PstI-Bsp1286I-Fragment (~70 bp), enthaltend die DNA, die für die Aminosäuren 16-38 von IGF-I kodiert, wurde aus pLBIGFTsc isoliert. Das Bsp1286I-HindIII-Fragment (~179 bp), enthaltend DNA, die für die Aminosäuren 39-70 von IGF-I kodiert, den λ -Terminator und den Tc-Promotor, wurde aus pLS33Tsc ausgeschnitten. Schließlich wurde das EcoRI-HindIII-Vektor-Fragment (~4331 bp) (pBR322-basierend) aus pRanTsc ausgeschnitten. Diese vier Fragmente wurden ligiert, um pBKIGF-2 zu ergeben, das den AP-Promotor, die λ B-Signalsequenz, die für das gesamte IGF-I-Protein kodierende DNA, den Transkriptionsterminator, den Tc-Promotor und die Tetracyclin- und Ampicillin-Resistenzmarker enthält.

Schritt 5: pBKIGF-2A

[0144] pBKIGF-2 wurde mit PstI und ClaI verdaut, und das ~245-bp-Fragment wurde isoliert. Dies enthält die Aminosäuren 16-70 von IGF-I und den λ -t₀-Terminator. pLBIGFTsc wurde mit NcoI und ClaI verdaut, und das Vektorfragment wurde isoliert. Dieses Vektorfragment enthält den AP-Promotor, das λ B-Signal und das Tet^r-Gen. Diese beiden Fragmente wurden an ein Stück synthetischer DNA ligiert, das, wie folgt, das 5'-Ende der IGF-I-DNA von NcoI bis PstI mit Codons synthetischer Abstammung ersetzt:

```
5' -CATGGCC GGT CCC GAA ACT CTG TGC GGT GCT GAA CTG GTT GAC GCT CTG CA-3'
3' -   CGG CCA GGG CTT TGA GAC ACG CCA CGA CTT GAC CAA CTG CGA G-5'
```

(Seq.-ID Nr. 4 bzw. 5.)

[0145] Das resultierende Plasmid wurde pBKIGF-2A genannt. Die Konstruktion ist in [Fig. 7](#) dargestellt.

Schritt 6: pLamBRan

[0146] Dieses Plasmid wurde durch Verdau von pLS33LamB mit NcoI und BamHI hergestellt, und es wurde das Vektorfragment isoliert. pLS33LamB ist ein Plasmid, das aus pBR322 hergestellt wurde, in das der AP-Promotor, das λ B-Signal und das IGF-I-Gen insertiert wurde. BamHI schneidet im Tc-Abschnitt des Plasmids, und NcoI schneidet am 5'-Ende des IGF-I-Gens. Das zweite Fragment wurde durch Verdau von pRANTES mit BsaJI und BamHI sowie durch Isolierung des resultierenden ~200-bp-Fragments erzeugt. Das dritte Fragment war ein Teil einer synthetischen DNA, um das RANTES-Gen mit der Signalsequenz von NcoI bis BsaJI zu verbinden. Diese synthetische DNA besitzt folgende Sequenz:

```
NcoI                               BsaJI
5' -CATGGCCTCCCATATTC-3'
3' -CGGAGGGGTATAAGGAGC-5'
```

(Seq.-ID Nr. 6 bzw. 7.)

[0147] Der resultierende Vektor wurde pLamBRan genannt, und seine Konstruktion ist in [Fig. 8](#) dargestellt.

Schritt 7: pBKIGF-2B

[0148] Die Konstruktion dieses Plasmids wird in [Fig. 9](#) gezeigt. PLamBRan wurde mit NcoI und SphI verdaut, und es wurde das Vektorfragment, enthaltend den Promotor und die Signalsequenz, isoliert. pBKIGF-2 wurde mit DdeI und SphI verdaut, und das 600-bp-Fragment, enthaltend den λ -Transkriptionsterminator und das 5'-Ende des Tet^R-Gens, wurde isoliert. pBKIGF-2A wurde mit NcoI und Bsp1286I verdaut, und das ~110-bp-Fragment, enthaltend die für die Aminosäuren 1-38 von IGF-I kodierende DNA, wurde isoliert. Diese drei Fragmente wurden mit synthetischer DNA aneinander ligiert, die für die Aminosäuren 39-70 von IGF-I kodiert, um pBKIGF-2B zu ergeben. Dieser synthetische Linker besitzt folgende Sequenz:

5'-TCGTCGTGCTCC CAG ACT GGT ATT GTT GAC GAA TGC TGC TTT CGT TCT TGC GAC CTC CGT CGT CTC-3'

(Seq.-ID Nr. 8)

3'-AGA ACC CTC GAC GCA GCA GAC CTT

TAC ATA ACC CGA GCG GAC TTT GGG CGATTAGACGAATCTTCGAGG-5'

(Seq.-ID Nr. 9)

C. Fermentations- und Gewinnungsverfahren

i. Transformation

[0149] Kompetente E.-coli-27C7-Zellen wurden mit pBKIGF-2B durch Standardtransformationsverfahren transformiert. Transformanten wurden ausgewählt und auf LB-Platten, die 20 mg/l Tetracyclin enthielten, gereinigt. Dieses Medium besaß die folgende Zusammensetzung: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid und 20 mg/l Tetracyclin-HCl.

ii. Fermentations-Inokulum

[0150] Ein 10-l-Fermenter-Inokulum wurde zuerst durch Impfen einer Zweiliter-Schüttelflasche hergestellt, enthaltend etwa 500 ml eines sterilen LB-Mediums, enthaltend Tetracyclin mit einer oben beschriebenen, frisch aufgetauten 1-2-ml-Kulturphiole. Die Flasche wurde bei 35-39 °C 8 Stunden lang inkubiert und in einen 10-Liter-Fermenter transferiert, der das Produktionsmedium in dem Bereich von jenem enthielt, der in Abschnitt C dieses Beispiels beschrieben wurde. Das 10-Liter-Fermenter-Inokulum wurde bei 35-39 °C bei einem pH von 7,1-7,5 für eine Zeitspanne von 6-12 Stunden inkubiert. Die Rührgeschwindigkeit wurde bei 650-1000 Umdrehungen pro Minute festgelegt, und die Belüftungsrate wurde bei 0,7-1,5 Volumeneinheiten an Luft pro Volumeneinheit Kultur pro Minute festgelegt. Das Inokulum wurde anschließend aseptisch in ein 1000-l-Fermentationsgefäß transferiert, in das vom Boden her Glukose eingeführt wird.

[0151] Das 10-l-Inokulum wurde wie die 500-ml-Schüttelflaschenkultur auf eine mittlere exponentielle Phase heranwachsen gelassen (Batch-Kultivierung). Die gesamte Glukose wurde zu dem 10-l-Fermenter zu Beginn der Fermentation hinzugefügt. Nur die 1000-l-Fermentation verwendete eine Glukose-Zuführung.

iii. Fermentationsverfahren

[0152] Das 1000-l-Gefäß enthielt anfänglich 600-800 Liter an Fermentationsmedium, das wie folgt zusammengesetzt war:

Bestandteil	Menge/Liter
Glukose*	250-350 g
Ammoniumsulfat	3-8g von
Ammoniumhydroxid	je nach Anforderung zur Kontrolle von pH 7,1 bis 7,5

Natriumphosphat, monobasisches Dihydrat	1-2 g
Kaliumphosphat, dibasisch	2-4 g
Natriumcitrat, Dihydrat	0,5-1,5 g
Kaliumchlorid	1-2,5 g
25 % Pluronic Polyol L61	0,1-0,2 ml anfänglich und je nach Anforderung, um die Schaumbildung zu kontrollieren
Magnesiumsulfat, Heptahydrat	1-3 g
Tetracyclin-HCl	5-20 mg
Hefeextrakt**	5-20 g
NZ-Amin-AS**	5-25 g
Isoleucin	0-10 g
Methionin**	0-1 g
Eisen(III)-chlorid, Heptahydrat	10-30 mg
Zinksulfat, Heptahydrat	2-5 mg
Kobaltchlorid, Hexahydrat	2-5 mg
Natriummolybdat, Dihydrat	2-5 mg
Kupfer(II)-sulfat, Pentahydrat	2-5 mg
Borsäure	0,5-2 mg
Mangansulfat, Monohydrat	1-3 mg

* 1-5 g/l Glukose wurden anfänglich zu der Kultur hinzugefügt. Der Rest wurde der Kultur während der Fermentation zugeführt.

** Hefeextrakt, NZ-Amin-AS und Methionin können anfänglich hinzugefügt werden und/oder während der Fermentation zugeführt werden.

[0153] Der Fermentationsprozess wurde bei 35-39 °C bei einem pH von 7,1-7,5 für eine Zeitspanne von 24-48 Stunden durchgeführt. Die Rührgeschwindigkeit wurde bei 200 Umdrehungen pro Minute festgelegt, und die Belüftungsrate wurde bei 0,7-1,5 Volumeneinheiten an Luft pro Volumeneinheit Kultur pro Minute festgelegt. Die Produktion von IGF-I erfolgte, nachdem das Phosphat in dem Medium verarmt war. Dieses Verfahren führte zu einer Fermentationsnährlösung, die etwa 18 % gepacktes Zellvolumen enthielt und über 3 g/l IGF-I, das hauptsächlich im periplasmatischen Raum zu finden war, mit niedrigen Mengen im extrazellulären Medium.

D. In-situ-Solubilisierung

[0154] Am Ende der Fermentation wurden mit Ausnahme der Temperatur alle Zuleitungen und Steuerungen abgedreht. Die Temperaturkontrolle wurde bei 37 °C gehalten. Der Sprenger wurde abgeschaltet, und der Gegendruck des Fermenters wurde abgelassen. Das Volumen der Nährlösung wurde auf 1200 l abgelassen und die Rührgeschwindigkeit von 200 auf 150 Umdrehungen pro Minute herabgesetzt. Die Spreng-Linien und der Fermenter-Kopfraum wurden anschließend mit Stickstoffgas gespült, zuerst mit einer Rate von 150 l/min 1 Minute lang, anschließend von 50 l/min für das verbleibende Verfahren. Eine 220-l-Aufschlammung, die 174 kg Harnstoff enthielt, wurde anschließend schnell in den Fermenter gepumpt, sofort gefolgt von etwa 8 l 50 Gew.-% Natriumhydroxid, ausreichend, um den pH auf 10,0 einzustellen. Schließlich wurde eine 20-l-Lösung, enthaltend 2,9 kg Dithiothreit, hinzugefügt, und der pH wurde mit etwa 3 zusätzlichen Litern an 50 % Natriumhydroxid erneut auf 10,0 eingestellt. Die Charge wurde bei 37 °C 60 Minuten lang gerührt, nachdem sie auf 22 °C abgekühlt wurde und für die wässrige Zweiphasen-Extraktion in ein Auffangbecken transferiert wurde. Tests durch Umkehrphasen-HPLC zeigten, dass der anfängliche Titer von IGF-I bei 3,8 g/l lag, und nach der Solubilisierung wurde IGF-I quantitativ aus den Zellen freigesetzt.

E. Wässrige Zweiphasen-Flüssig-Flüssig-Extraktion

[0155] Die Chargentemperatur wurde bei 22 °C gehalten, und der Kopfraum des Behälters wurde mit Stickstoff gespült. Zu der behandelten Nährlösung mit einem Volumen von 1450 l wurden 250 kg PEG-8000 und 90 kg Natriumsulfat hinzugefügt. Die Charge wurde etwa 40 Minuten lang gerührt. Eine Zentrifugierung und eine Analyse der Proben zeigten, dass sich das Phasen-Volumen-Verhältnis (Kv) bei 2,6 stabilisierte und dass der IGF-I-Verteilungskoeffizient (Kc) bei 8,5 lag. Die Charge wurde unter Verwendung eines Westfalia-SB-7-Separators getrennt und ergab etwa 1300 l leichte Phase und 550 l schwere Phase. Tests mittels Umkehrphasen-HPLC zeigten, dass die isolierte leichte Phase etwa 88 % des IGF-I in den anfänglichen 1450 l an behandelte Nährlösung enthielt. Die leichte Phase wurde unter Stickstoff gehalten, und die schwere Phase wurde

verworfen.

F. Präzipitation von IGF-I

[0156] Etwa 36 l von 2 M Phosphorsäure wurde zu der leichten Phase hinzugefügt, um den pH auf 7,0 bei 22 °C anzupassen. Die Charge wurde etwa 8 Stunden lang bei leichtem Mischen gehalten, wobei zu diesem Zeitpunkt ein Test mittels Umkehrphasen-HPLC zeigte, dass etwa 96 % des IGF-I präzipitierten. Das Pellet wurde anschließend unter Verwendung eines Westfalia-SB-7-Klärapparats gesammelt. Die Masse der Pelletaufschlammung lag bei etwa 88 kg.

G. Umfaltung

[0157] Ein aliquoter Teil der Pelletaufschlammung mit einer Masse von 17,6 kg wurde durch Hinzufügen von ausreichend festem Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 2 M aufgelöst, und zwar durch Hinzufügen von ausreichend Dithiothreitol, um die Konzentration auf 10 mM zu bringen, und durch Anpassen des pH auf 10,0 mit 50 Gew.-% Natriumhydroxid. Anschließend wurde dieser zu 700 l Faltungspuffer mit einer Zusammensetzung von 2 M Harnstoff, 1 M Natriumchlorid, 19 Vol.-% Ethanol, 20 mM Glycin, 0,5 µM Kupfer, pH 10,5, hinzugefügt. Die Endkonzentration von Dithiothreitol wurde anschließend auf 1 mM eingestellt. Die Faltung wurde bei 22 °C unter leichtem Rühren durchgeführt, und zwar durch Einsprengen von Sauerstoffgas bei 280 ml/Minute. Der Faltungsfortschritt wurde mittels Umkehrphasen-HPLC überwacht. Repräsentative HPLC-Chromatogramme, die am Anfang, in der Mitte und nach Beendigung der Faltung erstellt wurden, sind in [Fig. 10](#) dargestellt. Nach etwa 3 Stunden war die Faltung durch Beendigung der Sauerstoffbesprengung und durch Titrierung der Charge bis auf einen pH von 3,5 mit etwa 1,6 l des Reagens Phosphorsäure beendet. Ein Test mittels Umkehrphasen-HPLC zeigte, dass die Ausbeute der Faltung bei 50 % lag.

Beispiel II

[0158] Die Wirtskonstruktion, Plasmidkonstruktion und Fermentation wurden, wie in Beispiel I, Abschnitte A-C, beschrieben, durchgeführt. Die In-situ-Solubilisierung wurde, wie in Beispiel I, Abschnitt D, beschrieben, durchgeführt, außer, dass die Nährlösung anstatt durch die Verwendung von DTT durch die Addition von ausreichendem L-Cystein reduziert wurde, um die Endkonzentration bis auf 50 mM (etwa 8,8 kg) zu erreichen. Am Ende der Solubilisierung zeigte ein Test mittels Umkehrphasen-HPLC, dass 93 % des IGF-I aus den Zellen freigesetzt wurden.

[0159] Die darauf folgende Isolierung wurde durch verkleinerte Versionen der in Beispiel I, Abschnitte E-G, beschriebenen Operationen durchgeführt.

Beispiel III

[0160] Nicht nativer IGF-I wurde unter Verwendung des Wirts, des Plasmids, der Fermentation und des In-situ-Solubilisierungsverfahrens, beschrieben in Beispiel I, Abschnitte A-D, hergestellt.

[0161] Wässrige Zweiphasen-Systeme wurden unter Verwendung des folgenden Verfahrens hergestellt: (1) phasenbildende Spezies wurde in einem graduieren 15-ml-Polystyrol-Kultur-Röhrchen platziert; (2) 7 ml des Gesamtextrakts aus In-situ-Solubilisierung wurden hinzugefügt, die Inhalte wurden gemischt, und der Kopfraum wurde mit Stickstoff gespült; (3) die Zusammensetzung wurde zwei Stunden lang bei entweder Raumtemperatur oder bei 37 °C mit Ende-über-Ende-Mischung inkubiert. Polymere wurden aus Stammlösungen (50 Gew.-% PEG-Mr-3350-Polymer, 50 Gew.-% PEG-Mr-8000-Polymer und 100 % Gew.-% DOW-Polyglykol-15-200TM-Markenpolymer) hinzugefügt, während Salze als trockene Chemikalien hinzugefügt wurden. Komponenten wurden auf einer Gewicht-Gewicht-Basis hinzugefügt, um eine vorherbestimmte Zusammensetzung zu erreichen, und zwar unter der Annahme, der ganze Extrakt hätte eine Dichte von 1 g/ml.

[0162] Phasen wurden mittels 20-minütiger Zentrifugierung bei entweder 25 °C oder 37 °C bei etwa 1300 g getrennt. Die Konzentration von IGF-I in der oberen Phase wurde mittels Umkehrphasen-HPLC-Analyse bestimmt. Die Konzentration von IGF-I in der unteren Phase wurde unter Verwendung einer Massenbilanzannahme berechnet.

[0163] Es wurden drei Experimente durchgeführt, in denen die Konzentration und der Typ von phasenbildendem Polymer, die Konzentration und der Typ von phasenbildendem Salz, die Konzentration und der Typ von nicht phasenbildendem Salz und die Temperatur variierten. Die resultierenden Systeme konnten visuell als zu

einer der fünf aufgelisteten Kategorien gehörig charakterisiert werden: (1) Einphasen-Systeme, (2) Zweiphasen-Systeme, in denen sich Feststoffe in der unteren Phase absetzen, (3) Zweiphasen-Systeme, in denen einige Feststoffe in der unteren Phase schwimmen, (4) Zweiphasen-Systeme, in denen Feststoffe sowohl in der oberen als auch der unteren Phase verteilt sind, und (5) Zweiphasen-Systeme, in denen Feststoffe in der oberen Phase verteilt sind.

[0164] Das in [Fig. 11](#) dargestellte Diagramm zeigt die Beziehung zwischen Systemzusammensetzung und -disposition für Systeme, die nur aus Gesamtextrakt, PEG-8000 und Na_2SO_4 bestehen. In diesem Diagramm bezeichnet ein „Zweiphasen-System mit schwimmenden Feststoffen“ alle Zweiphasen-Systeme, in denen Feststoffe sich nicht in die untere Phase absetzen. Das Diagramm bezeichnet ebenso den Grenzwert zur Beschreibung von Systemen, in denen sich Feststoffe in eine untere Phase absetzen, die gerade groß genug ist, um ihr Volumen unterzubringen. Die am meisten bevorzugten Systeme, in denen sich Feststoffe in die untere Phase absetzen, wobei das Volumen der niedrigeren Phase ausreichend ist, um Feststoffe unterzubringen, und worin das Phasen-Volumen-Verhältnis größer als etwa 1 ist, sind in der schraffierten Region enthalten.

[0165] Diese drei Experimente ergaben ebenso Daten, die es den zwei unterschiedlichen wässrigen Zweiphasen-Systemen ermöglichen, wie in Tabelle I dargestellt, quantitativ verglichen zu werden. Um Fehler zu reduzieren und um die Wirkung einer bestimmten Veränderung offensichtlicher erscheinen zu lassen, wurden Volumenverhältnis- und Verteilungskoeffizient-Daten für mehrere verschiedene Systeme, wie angegeben, als Durchschnittswert angegeben. Resultate dieser Analyse deuten auf mehrere Trends hin. Die Polymere PEG-8K und PEG-4K (mit Mr-Werten von 8000 bzw. 3350) bilden Systeme mit ähnlichen Volumenverhältnissen, in denen sich nicht nativer IGF-I ähnlich verteilt. Das Einschließen von NaCl in den untersuchten Phasensystemen beeinflusst das Volumenverhältnis nicht, senkt jedoch den IGF-I-Verteilungskoeffizienten. Die Hinzufügung des zufälligen Polyethylenglykol-Polypropylenglykol-Copolymers DOW-Polyglykol-15-200™-Markenpolymer (Mr 2500) verändert das Volumenverhältnis oder den Verteilungskoeffizienten nicht. Das Einschließen des phasenbildenden Salzes Citrat in PEG-8000- und Na_2SO_4 -Systemen verschiebt die Position der binodalen Kurve, beeinflusst jedoch die IGF-I-Verteilung nicht. Die Durchführung der wässrigen Zweiphasen-Extraktion bei 37 °C verringert das Volumenverhältnis und den Verteilungskoeffizienten in Bezug auf 25 °C.

TABELLE I

Durchschnittliche Wirkung von wässrigen Zweiphasen-Effektoren auf Kv und Kc

<u>Zustand</u>	<u>n</u>	<u>Kv</u>	<u>Kc</u>	<u>Durchschnitt ermittelt über</u>
<u>Experiment Nr. 1</u>				
7 % Na ₂ SO ₄ /PEG-8K	6	1,09	2,5	[PEG] = 10, 15 Gew.-% [NaCl] = 0, 3, 6 Gew.-%
7 % Na ₂ SO ₄ /PEG-4K	6	0,99	2,7	
<u>Experiment Nr. 1</u>				
7 % Na ₂ SO ₄	4	1,03	2,9	[PEG] = 10, 15 Gew.-% PEG-Mr = 4, 8 kD
7 % Na ₂ SO ₄ , 6 % NaCl	4	1,06	2,3	
<u>Experiment Nr. 2</u>				
7 % Na ₂ SO ₄ /PEG-8K	9	0,58	1,6	[PEG-8K] = 5, 7, 10 Gew.-% [NaCl] = 0, 3 Gew.-% [Citrat] = 0, 3 Gew.-%
7 % Na ₂ SO ₄ /PEG-8K + 2 % EP15-200	9	0,57	1,5	
<u>**Experiment Nr. 2</u>				
7 % Na ₂ SO ₄	6	0,60	1,6	[PEG-8K] = 5, 7, 10 Gew.-% [EP15-200] = 0, 2 Gew.-%
5 % Na ₂ SO ₄ , 3 % Citrat	6	0,60	1,5	
<u>Experiment Nr. 3</u>				
25 °C	6	1,95	2,0	[PEG-8K] = 12, 14, 16 Gew.-% [Na ₂ SO ₄] = 5, 6 Gew.-%
37 °C	6	1,76	1,8	

** Es wurde der Durchschnitt der Daten auf eine Art und Weise errechnet, um Veränderungen in der Position der binodalen Kurve Rechnung zu tragen.

Beispiel IV

[0166] Nicht nativer IGF-I wurde unter Verwendung des Wirts, des Plasmids, der Fermentation und des In-situ-Solubilisierungsverfahrens, beschrieben in Beispiel I, Abschnitte A-D, hergestellt.

[0167] Wässrige Zweiphasen-Systeme wurden wie in Beispiel III beschrieben hergestellt, jedoch mit der Ausnahme, dass PEG-8000 in trockener Form hinzugefügt wurde und nicht als Stammlösung. Die Konzentrationen von IGF-I in der oberen Phase und in der unteren Flüssigphase wurden mittels Umkehrphasen-HPLC-Analyse bestimmt. Die untere Flüssigphase wurde vor der Analyse einer 0,2-µm-Filtration unterzogen, um restliche suspendierte Feststoffe zu entfernen.

[0168] Die Ergebnisse der direkten Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von nicht nativem IGF-I in wässrigen Zweiphasen-Systemen sind in Tabelle II dargestellt. Mit einer Bedingung von 5 Gew.-% Na₂SO₄, 14 Gew.-% PEG-8000 besitzt der Verteilungskoeffizient eine Größe von 9 bis 10. Eine Zunahme von 1 Gew.-% der Salzkonzentration oder eine Zunahme von 2 Gew.-% der Polymerkonzentration verdoppelt die Größe. Kombinierte Zunahmen der Salz- und Polymerkonzentrationen führen zu einer vierfachen Steigerung, was zu einem Wert um 40 führt. Diese letztere Kombination führt zu der Bildung eines Zweiphasen-Systems mit schwimmenden Feststoffen.

TABELLE II

Verteilungskoeffizient des Gesamtextrakt-IGF-I in wässrigen PEG-8000/Na₂SO₄-Zweiphasen-Systemen

Na ₂ SO ₄ (Gew.-%)	PEG-8K (Gew.-%)		
	12	14	16
5	1-Phase	9,0	19,1
		2,38	2,04
		96	98
6		12,0	41
		1,29	1,24
		94	98

[0169] Die Werte bezeichnen, jeweils von oben nach unten, Folgendes: IGF-I-Verteilungskoeffizient (gemessen), Phasen-Volumen-Verhältnis, Prozentsatz der Masse an löslichem Gesamtextrakt-IGF-I in der oberen Phase.

Beispiel V

[0170] Nicht nativer IGF-I wurde unter Verwendung der Fermentation, der In-situ-Solubilisierung sowie unter Verwendung wässriger Zweiphasen-Extraktionsverfahren hergestellt, wie in Beispiel I, Abschnitte A-E, beschrieben. Zur IGF-I-Präzipitation wurde ein Teil der leichten Phase in mehrere aliquote Teile geteilt, die anschließend unter Verwendung einer der folgenden Säuren auf einen pH von etwa 6 titriert wurden: 2 N Phosphor-, 2 N Essig-, 2 N Schwefel-, 2 N Salzsäure, 2 N Zitronen- oder 2 N Salpetersäure. Die aliquoten Teile wurden anschließend kurz bei etwa 5000 × g 15 Minuten lang zentrifugiert, und die überstehenden Flüssigkeiten wurden dekantiert. Tests mittels Umkehrphasen-HPLC zeigten, dass in allen Fällen zumindest 93 % des anfänglichen IGF-I im Pellet gewonnen wurde. Die darauf folgende Proteinfaltung der Pellets wurde mittels einer verkleinerten Version des in Beispiel I, Abschnitt G, beschriebenen Verfahrens durchgeführt.

Beispiel VI

[0171] Nicht nativer IGF-I wurde unter Verwendung der Fermentation, der In-situ-Solubilisierung sowie unter Verwendung wässriger Zweiphasen-Extraktionsverfahren hergestellt, wie in Beispiel I, Abschnitte A-E, beschrieben.

[0172] Eine Probe der leichten Phase aus Teil E in Beispiel I wurde in mehrere kleinere aliquote Teile geteilt, und es wurde eine Säurepräzipitation durch Titrierung dieser aliquoten Teile entweder auf einen pH von 10, 4,5, 4,0, 3,5 oder 3,0 begonnen, und zwar unter Verwendung von 2 M Schwefelsäure. Jeder dieser fünf Stammlösungen wurde dann weiter in fünf aliquote Teile geteilt, die ausreichend festes Natriumsulfat erhielten, um eine Endkonzentration von entweder 3, 4, 5, 6 oder 7 Gew.-% zu ergeben. Die Proben wurden zwei Stunden lang bei 25 °C unter leichtem Rühren inkubiert. Die Phasen wurden anschließend nach der Zentrifugierung bei etwa 5000 × g 20 Minuten lang getrennt. Die IGF-I-Konzentration wurde mittels Umkehrphasen-HPLC getestet.

[0173] Für alle Natriumsulfatmengen bei einem pH von 10 verblieb mehr als 95 % des IGF-I in der oberen Phase. Für alle Proben bei allen anderen pH-Werten (4,5 bis 3,0) wurde mehr als 98 % des IGF-I in der unteren Phase gewonnen:

Beispiel VII

[0174] Nicht nativer IGF-I wurde unter Verwendung der Fermentation, der In-situ-Solubilisierung sowie unter Verwendung der wässrigen Zweiphasen-Extraktion und des Neutralisierungspräzipitationsverfahrens, beschrieben in Beispiel I, Abschnitte A-G, hergestellt.

[0175] Eine Suspension, die den reduzierten IGF-I enthielt, wurde aus dem durch die Neutralisierungspräzipitation hergestellten IGF-I-Pellet erzeugt. Um diese Suspension zu erzeugen, wurden 30 g des nassen Pellets, enthaltend IGF-I, in einer Lösung resuspendiert, die 20 mM Glycin (pH 10,5), 2 M Harnstoff und 10 mM DTT enthielt, und zwar bis zu einem Endvolumen von 100 ml. Der pH der resultierenden Suspension wurde durch die Zugabe von NaOH und HCl, je nach Bedarf, auf einen pH von 10,5 eingestellt. Eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse der Suspension zeigte an, dass sie 35 mg/ml IGF-I enthielt.

[0176] Die Umfaltungspuffer wurden in 15-ml-Polystyrolkultur-Röhrchen hergestellt, und zwar durch die Zugabe geeigneter Mengen der folgenden Stammlösungen: 1 M Glycin (pH 10,5) und 25 μ M CuCl_2 , 9 M Harnstoff, 100 % Ethanol, 1,8 M Na_2SO_4 , 20 Vol.-% PEG-3350 und 20 Vol.-% PEG-8000. Jedes Röhrchen erhielt 0,1 ml der 50X-Puffer-Stammlösung, die Glycin und CuCl_2 enthielt. Andere Stammlösungen wurden hinzugefügt, um die angegebene Konzentration mit einem Endvolumen von 5 ml zu erreichen. Jedes Röhrchen, das Umfaltungspufferkomponenten enthielt, wurde auf ein Endvolumen von 4 ml gebracht.

[0177] Die IGF-I-Umfaltung wurde durch Verdünnen von 1 ml der reduzierten IGF-I-Suspension in die zuvor hergestellten Umfaltungspuffer begonnen, wodurch eine anfängliche IGF-I-Konzentration von 7 mg/ml erreicht wurde. Die Röhrchen wurden verschlossen und horizontal auf einem Rundschüttler geschüttelt. Jedes Röhrchen enthielt 5 ml Flüssigkeit und 10 ml Luft. Die Umfaltung wurde für eine Zeitspanne von drei Stunden stattfinden gelassen, wonach Proben gesammelt wurden, durch einen Faktor von 10 in einen angesäuerten-Puffer verdünnt wurden, der 20 mM Glycin (pH 3), 2 M Harnstoff enthielt, und schließlich mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert wurden, um den Gehalt an korrekt gefaltetem IGF-I zu bestimmen.

[0178] Das Ziel dieses Beispiels ist es, die Wirkung von wässrigen phasenbildenden Komponenten auf die Ausbeute von korrekt gefaltetem IGF-I zu zeigen, der während der Umfaltung erhalten wurde. Die untersuchten spezifischen, phasenbildenden Komponenten waren Na_2SO_4 , PEG-3350, PEG-8000 und Ethanol. Die untersuchten Konzentrationen standen in Einklang mit jenen, die durch Verdünnen einer isolierten wässrigen Phase durch einen Faktor von 10 bis 15 produziert werden können.

[0179] Resultate, dargestellt in Tabelle III, zeigen, dass die Ausbeute an korrekt gefaltetem IGF-I durch die Umfaltung von IGF-I in Gegenwart der phasenbildenden Komponenten Ethanol und Na_2SO_4 verbessert wird. Die Ausbeute von IGF-I wird durch die Gegenwart der phasenbildenden Komponenten PEG-3350 oder PEG-8000 nicht beeinträchtigt.

TABELLE III

Wirkung von wässrigen phasenbildenden Spezies auf die Ausbeute der IGF-I-Umfaltung

Na ₂ SO ₄ (M)	Kein Ethanol		
	Kein PEG	PEG-3350 0,88 Gew.-%	PEG-8000 1,05 Gew.-%
0	11,4 %	11,6 %	11,3 %
0,1	11,9 %	11,6 %	11,4 %
0,3	9,4 %	9,7 %	9,3 %
0,6	4,4 %	4,0 %	3,8 %

Na ₂ SO ₄ (M)	20 Vol.-% Ethanol		
	Kein PEG	PEG-3350 0,88 Gew.-%	PEG-8000 1,05 Gew.-%
0	22,7 %	23,0 %	23,6 %
0,1	25,7 %	*	23,2 %
0,3	28,4 %	28,3 %	28,3 %
0,6	26,4 %	25,8 %	25,8 %

Die anfängliche Konzentration von IGF-I lag bei 7 mg/ml.

Beispiel VIII

[0180] Nicht nativer IGF-I wurde unter Verwendung der Fermentation, der In-situ-Solubilisierung sowie unter Verwendung der wässrigen Zweiphasen-Extraktion und der Neutralisierungspräzipitationsverfahren, beschrieben in Beispiel I, Abschnitte A-G, hergestellt.

[0181] Eine Suspension, die den reduzierten IGF-I enthält, wurde aus dem durch die Neutralisierungspräzipitation hergestellten IGF-I-Pellet erzeugt. Um diese Suspension zu erzeugen, wurden 10 g des nassen Pellets, enthaltend IGF-I, in 45 ml einer Lösung resuspendiert, die 20 mM Glycin (pH 10,5), 2 M Harnstoff und 10 mM DTT enthält. Der pH der resultierenden Suspension wurde durch die Zugabe von NaOH, je nach Bedarf, auf einen pH von 10,5 eingestellt. Eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse der pH-eingestellten Suspension zeigte an, dass sie 15 mg/ml IGF-I enthält. Die pH-eingestellte Suspension wurde mit einer konzentrierten DTT-Lösung versetzt, um eine End-DTT-Konzentration von 15 mM zu erhalten. Die resultierende reduzierte IGF-I-Suspension enthielt 15 mg/ml IGF-I, 20 mM Glycin (pH 10,5), 2 M Harnstoff und 15 mM DTT.

[0182] Die Umfaltungspuffer wurden in 15-ml-Polystyrol-Kulturröhrchen hergestellt, und zwar durch die Zugabe geeigneter Mengen verschiedener Stammlösungen und trockener Chemikalien. Jedes Röhrchen erhielt 0,1 ml einer 50X-Puffer-Stammlösung, die 1 M Glycin (pH 10,5) und 25 µM CuCl₂ enthält. Geeignete Mengen anderer Chemikalien wurden hinzugefügt, um die angegebene Konzentration mit einem Endvolumen von 5 ml zu erreichen. Ethanol und Glycerin wurden als Flüssigkeiten hinzugefügt. Harnstoff, NaCl und Na₂SO₄ wurden in trockener Form hinzugefügt. Jedes Röhrchen, das Umfaltungspufferkomponenten enthielt, wurde auf ein Endvolumen von 4,7 oder 3,7 ml gebracht, in Abhängigkeit davon, ob die Umfaltung bei 1 bzw. 4 mg/ml IGF-I durchgeführt werden sollte.

[0183] Die IGF-I-Umfaltung wurde durch Verdünnen von 0,3 oder 1,3 ml der reduzierten IGF-I-Suspension für die Umfaltung bei 1 bzw. 4 mg/ml IGF-I in die zuvor hergestellten Umfaltungspuffer begonnen. Die Röhrchen wurden verschlossen und horizontal auf einem Rundschüttler geschüttelt. Jedes Röhrchen enthielt 5 ml Flüssigkeit und 10 ml Luft. Die Umfaltung wurde für eine Zeitspanne von 8 Stunden ermöglicht, wonach Proben gesammelt wurden, angesäuert wurden und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert wurden, um den Gehalt

an korrekt gefaltetem IGF-I zu bestimmen.

[0184] Die folgenden Aspekte der Umfaltungspufferzusammensetzung wurden untersucht: Salztyp und -konzentration (0, 0,5, 1,0 M NaCl; oder 0, 0,2, 0,6 M Na₂SO₄), chaotrope Konzentration (1, 2, 3 M Harnstoff), Lösungsmittelkonzentration (0, 10, 20 Vol.-% Ethanol), Osmolytenkonzentration (0, 20, 30 Vol.-% Glycerin) und die anfängliche IGF-I-Konzentration (1, 4 mg/ml). Die durch ausgewählte Kombinationen dieser Komponenten erhaltenen Ausbeuten sind in Tabelle IV gezeigt. Eine Inspektion zeigt, dass die höchste Ausbeute an korrekt gefaltetem IGF-I durch die Umfaltung unter folgender Bedingung erhalten wurde: 1 mg/ml IGF-I, 20 mM Glycin (pH 10,5), 2 M Harnstoff, 1 M NaCl, 20 Vol.-% Ethanol und 0,5 µM CuCl₂ (Probe Nr. 0).

[0185] Das in diesem Beispiel beschriebene Experiment wurde kreiert, um eine mehrfaktorielle statistische Analyse an korrekt gefalteten IGF-I-Ausbeute-Daten zu ermöglichen, um die Bedeutung aller einzelnen Faktoren und aller Zweifaktor-Wechselwirkungen zu bewerten. Die Resultate dieser statistischen Analyse sind in den Tabellen V und VI gezeigt. Eine Inspektion dieser Resultate zeigt, dass unter den angewandten experimentellen Bedingungen folgende Tendenzen festzustellen waren: (1) die besten Ausbeute-Werte werden durch die Umfaltung bei niedrigen IGF-I-Konzentrationen erhalten; (2) das Inkludieren von Salz in einer Konzentration von etwa 1 M verbessert die Umfaltungsausbeute insbesondere in der Gegenwart von Ethanol; (3) NaCl ist ein stärker bevorzugtes Salz als Na₂SO₄; (4) man erhält eine bessere Ausbeute mit einer Umfaltung in 2-3 M Harnstoff im Vergleich zu einer niedrigeren Harnstoffkonzentration, obwohl der Unterschied in der Gegenwart von Ethanol verringert ist; (5) eine verbesserte Ausbeute wird verglichen mit der Abwesenheit von Lösungsmittel in Gegenwart von 20 Vol.-% Ethanol erhalten; und (6) das Inkludieren von Glycerin verbessert die Ausbeute, sein Vorteil wird jedoch in Gegenwart von Ethanol verringert.

TABELLE IV

Wirkung von Lösungsbedingungen auf die IGF-I-Umfaltungsausbeute

<u>Proben-</u> <u>nr.</u>	<u>Salz</u>	<u>[Salz]</u> <u>(M)</u>	<u>[IGF-I]</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>[Harn-</u> <u>stoff]</u> <u>(M)</u>	<u>[Ethanol]</u> <u>Vol.-%</u>	<u>[Glycerin]</u> <u>Vol.-%</u>	<u>Ausbeute</u> <u>IGF-I (%)</u>
0	NaCl	1	1	2	20	0	50
1	NaCl	1	1	3	20	30	39
2	NaCl	1	1	3	0	0	33
3	NaCl	0	1	3	20	0	38
4	NaCl	0	1	3	0	30	34
5	NaCl	1	1	1	20	0	49
6	NaCl	1	1	1	0	30	36
7	NaCl	0	1	1	20	30	34
8	NaCl	0	1	1	0	0	23
9	NaCl	0,5	1	2	10	20	44
10	NaCl	0,5	1	2	10	20	45
11	NaCl	1	4	3	20	0	33
12	NaCl	1	4	3	0	30	27
13	NaCl	0	4	3	20	30	24
14	NaCl	0	4	3	0	0	15
15	NaCl	1	4	1	20	30	31
16	NaCl	1	4	1	0	0	7
17	NaCl	0	4	1	20	0	21
18	NaCl	0	4	1	0	30	19
19	NaCl	0,5	4	2	10	20	30
20	NaCl	0,5	4	2	10	20	31
21	Na ₂ SO ₄	0,6	1	3	20	0	32
22	Na ₂ SO ₄	0,6	1	3	0	30	36
23	Na ₂ SO ₄	0	1	3	20	30	31
24	Na ₂ SO ₄	0	1	3	0	0	28
25	Na ₂ SO ₄	0,6	1	1	20	30	37
26	Na ₂ SO ₄	0,6	1	1	0	0	11
27	Na ₂ SO ₄	0	1	1	20	0	36
28	Na ₂ SO ₄	0	1	1	0	30	29
29	Na ₂ SO ₄	0,2	1	2	10	20	45
30	Na ₂ SO ₄	0,2	1	2	10	20	45
31	Na ₂ SO ₄	0,6	4	3	20	30	29
32	Na ₂ SO ₄	0,6	4	3	0	0	9
33	Na ₂ SO ₄	0	4	3	20	0	26
34	Na ₂ SO ₄	0	4	3	0	30	24
35	Na ₂ SO ₄	0,6	4	1	20	0	29
36	Na ₂ SO ₄	0,6	4	1	0	30	12
37	Na ₂ SO ₄	0	4	1	20	30	24
38	Na ₂ SO ₄	0	4	1	0	0	9

TABELLE V

Durchschnittliche Ausbeute an korrekt gefaltetem IGF-I durch Umfaltungslösungs-Komponente

A. Durch anfängliche IGF-I-Konzentration

<u>[IGF-I] (mg/ml)</u>	<u>Ausbeute IGF-I (%)</u>
1,0	32,9
4,0	21,2

B. Durch Salztyp

<u>Salz</u>	<u>Ausbeute IGF-I (%)</u>
NaCl	29,1
Na ₂ SO ₄	25,1

C. Durch Salzmenge

<u>Salzmenge</u>	<u>Ausbeute IGF-I (%)</u>
Keine	26,0
Hoch	28,2

D. Durch Harnstoffkonzentration

<u>[Harnstoff] (M)</u>	<u>Ausbeute IGF-I (%)</u>
1,0	25,4
3,0	28,8

E. Durch Ethanolkonzentration

<u>[Ethanol] (Vol.-%)</u>	<u>Ausbeute IGF-I (%)</u>
0,0	22,1
20,0	32,0

F. Durch Glycerinkonzentration

<u>[Glycerin] (Vol.-%)</u>	<u>Ausbeute IGF-I (%)</u>
0,0	24,9
30,0	29,3

TABELLE VI

Durchschnittliche Ausbeute an korrekt gefaltetem IGF-I durch Umfaltungslösungs-Kombinationen

A. Durch Ethanol- und Glycerinkonzentration

	<u>Kein Glycerin</u>	<u>30 % Glycerin</u>
Kein Ethanol	16,9	27,3
20 % Ethanol	32,9	31,2

B. Durch Ethanol- und Harnstoffkonzentration

	<u>1 M Harnstoff</u>	<u>3 M Harnstoff</u>
Kein Ethanol	18,3	25,9
20 % Ethanol	32,5	31,6

C. Durch Ethanol- und Salzkonzentration

	<u>Kein Salz</u>	<u>hoher Salzgehalt</u>
Kein Ethanol	22,9	21,4
20 % Ethanol	29,2	34,9

D. Durch Salztyp und Salzmenge

	<u>Kein Salz</u>	<u>hoher Salzgehalt</u>
NaCl	26,1	32
Na ₂ SO ₄	25,9	24,3

Beispiel IX

[0186] Eine reduzierte IGF-I-Stammlösung wurde aus hochgradig gereinigtem, korrekt gefaltetem IGF-I hergestellt. Eine Lösung, die 1 mg/ml IGF-I, 20 mM Glycin (pH 10,5), 2 mM Citrat, 0,1 M NaCl und 2 M Harnstoff enthielt, wurde in eine verstöpselten Phiole platziert, und der Kopfraum wurde etwa eine Stunde lang mit gelegentlichem Wirbeln mit befeuchtetem Argongas gespült. Nach der Desoxidation der Lösung wurde DTT über eine Injektionsspritze aus einer 117-mM-Stammlösung bis auf eine Endkonzentration von 1,17 mM hinzugefügt. Nach der DTT-Addition wurde die Lösung zwei Stunden lang mit kontinuierlicher Argon-Kopfraum-Spülung inkubiert.

[0187] Umfaltungslösungen wurden aus einer gemeinsamen Puffer-Stammlösung hergestellt, die 20 mM Glycin (pH 10,5), 0,1 M NaCl und 2 M Harnstoff enthielt. Diese Pufferstammlösung wurde in Phiolen abgefüllt, und CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, MnCl₂ und FeCl₃ wurden separat aus 1,3 mM Stammlösungen hinzugefügt. Die die resultierenden Lösungen enthaltenden Phiolen wurden verstöpselt, und die Flüssigkeit wurde kontinuierlich entweder mit befeuchtetem Argon oder Sauerstoff besprengt.

[0188] Um eine Umfaltungsreaktion zu beginnen, wurde ein aliquoter Teil an reduzierter IGF-I-Bestandslösung schnell um einen Faktor von 10 in eine Umfaltungslösung verdünnt. Die reduzierte IGF-I-Stammlösung wurde über eine Injektionsspritze transferiert, um die Umfaltung zu initiieren. Es wurden Kontroll-Umfaltungsreaktionen (mit fehlendem Übergangsmetallsalz) und Test-Umfaltungsreaktionen gleichzeitig durchgeführt und besaßen eine gemeinsame Gasquelle.

[0189] Proben wurden mittels einer Injektionsspritze aus Umfaltungsreaktionen nach 18 Minuten Oxidation gesammelt und schnell zu mit einem Septum verschlossenen Mikrophiolen hinzugefügt, die eine kleine Menge an 6 N HCl enthielten. Das Ausmaß der IGF-I-Umfaltung wurde durch Analyse der Proben mittels Umkehrphasen-HPLC bestimmt.

[0190] Wie in Tabelle VII gezeigt, führt das Aussetzen von reduziertem IGF-I gegenüber Sauerstoff in Gegenwart von entweder CuCl₂ oder MnCl₂ sowohl zu der Oxidation von reduziertem IGF-I als auch zu der Bildung von korrekt gefaltetem IGF-I. Die Gegenwart von CoCl₂ führte zu der Oxidation von reduziertem IGF-I, jedoch

auch zu der Bildung von weniger korrekt gefaltetem IGF-I. Sowohl NiCl₂ als auch FeCl₃ führten zu noch weniger Oxidation des reduzierten IGF-I und Bildung an korrekt gefaltetem IGF-I. Die Reaktion auf ZnCl₂ unterschied sich nicht von jener auf Spurenelemente.

TABELLE VII

Oxidationskatalyse mit verschiedenen Übergangsmetallionen

<u>Verbleibende Bedingung</u>	<u>% korrekt gefalteter IGF-I</u>	<u>% reduzierter IGF-I</u>
Argon, Spuren	0	77
O ₂ , Spuren	0	59
O ₂ , 13 µM CuCl ₂	13	0
O ₂ , 13 µM NiCl ₂	1,5	37
O ₂ , 13 µM ZnCl ₂	0	61
O ₂ , 13 µM CoCl ₂	2,3	3,8
O ₂ , 13 µM MnCl ₂	11	3,3
O ₂ , 13 µM FeCl ₂	1,6	29

Beispiel X

[0191] Eine reduzierte IGF-I-stammlösung wurde aus hochgradig gereinigtem, korrekt gefaltetem IGF-I hergestellt, wie in Beispiel IX beschrieben.

[0192] Umfaltungslösungen wurden aus einer gemeinsamen Puffer-Stammlösung hergestellt, die 20 mM Glycin (pH 10,5), 0,1 M NaCl und 2 M Harnstoff enthielt. Diese Pufferstammlösung wurde in Phiolen abgefüllt, und CuCl₂ wurde, wie erfordert, separat aus 1,3, 0,13, 0,013 und 0,0013 mM Stammlösungen hinzugefügt, die zuvor mittels Reihenverdünnung hergestellt wurden. Nachdem CuCl₂ hinzugefügt wurde, wurden die Phiolen verstöpelt, und die Flüssigkeit wurde kontinuierlich entweder mit befeuchtem Argon oder Sauerstoff besprengt.

[0193] Um eine Umfaltungsreaktion zu initiieren, wurde ein aliquoter Teil an reduzierter IGF-I-Stammlösung schnell um einen Faktor von 10 in eine Umfaltungslösung verdünnt. Die reduzierte IGF-I-Stammlösung wurde über eine Injektionsspritze transferiert, um die Umfaltung zu initiieren. Es wurden Kontroll-Umfaltungsreaktionen (mit fehlendem CuCl₂) und Test-Umfaltungsreaktionen gleichzeitig durchgeführt und besaßen eine gemeinsame Gasquelle.

[0194] Proben wurden mittels einer Injektionsspritze aus Umfaltungsreaktionen zu festgesetzten Zeitpunkten gesammelt und schnell zu mit einem Septum verschlossenen Mikrophiolen hinzugefügt, die eine kleine Menge an 6 N HCl enthielten. Diese Behandlung senkt den pH der Probe auf einen pH von 3 und quencht die Umfaltungsreaktion wirksam. Es wurden Proben gesammelt und zu den folgenden Zeitpunkten nach Beginn der Umfaltung gequencht: 0, 2, 4, 6, 10, 20, 40, 60, 100 und 200 Minuten. Das Ausmaß der IGF-I-Umfaltung in Bezug auf die Zeit wurde durch Analyse von Zeitverlauf-Proben mittels Umkehrphasen-HPLC bestimmt.

[0195] Es wurden die folgenden Konzentrationen an CuCl₂ untersucht: Spuren, 0,013 µM, 0,052 µM, 0,13 µM, 0,52 µM, 1,3 µM, 5,2 µM und 13 µM CuCl₂. Ein Diagramm der Evolution an korrekt gefaltetem IGF-I während der aeroben Oxidationskatalyse bei diesen CuCl₂-Konzentrationen ist in [Fig. 12](#) dargestellt.

[0196] Die Resultate zeigen, dass während der aeroben Oxidationskatalyse eine niedrige CuCl₂-Konzentration (zwischen etwa 0,05 µM und 15 µM, vorzugsweise zwischen 0,05 und 0,5 µM) eine höhere Ausbeute an korrekt gefaltetem Polypeptid erbringt als höhere Konzentrationen (höher als etwa 15 µM) und eine schnellere und reproduzierbare Oxidationskinetik ergibt als eine Spurenelementkatalyse.

[0197] Die in [Fig. 12](#) dargestellten Resultate wurden durch Umfaltung von IGF-I in Lösungen erhalten, denen alkoholisches oder polares aprotisches Lösungsmittel fehlt. Zusätzliche Experimente zeigten, dass das Inkludieren von Alkohol im Umfaltungspuffer die Abhängigkeit der IGF-I-Umfaltungskinetik und der Ausbeute von der CuCl₂-Konzentration nicht beeinflusste, und es wird nicht erwartet, dass es die Abhängigkeit von der Konzentration anderer Übergangsmetalle beeinflusst. Experimente zeigten ebenso, dass das Inkludieren von EDTA (molares Verhältnis von 1:1 zu CuCl₂) oder o-Phenanthrolin (molares Verhältnis von 3:1 zu CuCl₂) in Um-

faltungslösungen, die 1,3 µM CuCl₂ enthalten, die CuCl₂-katalysierte aerobe IGF-I-Oxidationskinetik nicht beeinflussen.

Beispiel XI

Fermentation

[0198] Die Konstruktion des Expressionsplasmids pHGH4R, das für die Expression und Sekretion von hGH verwendet wurde, wird ausführlich in Chang et al., Gene 55, 189-196 (1987), beschrieben.

[0199] Der E.-coli-Stamm 40G3 ist ein Derivat von E. coli W3110. Der vollständige Genotyp von 40G3 ist tonAΔ phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC ΔompT degP41 (ΔPstI-kan^r) ilvG2096^R phn(EcoB). Stamm 40G3 kann von E.-coli-W3110-Stamm 16C9 abstammen, der den Genotyp tonAΔ phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC besitzt. Die ompT-Deletion wurde durch P1-Cotransduktion mit einer verbundenen Tn10-Insertion in das purE-Gen eingeführt. Dieser Stamm wurde zu Purin-Phototrophie transduziert, um das Transposon zu entfernen. Die degP41-(ΔPstI-kan^r)-Mutation wurde durch Auswahl für die Kanamycinresistenz eingeführt. Das ilvG2096^R-Gen wurde unter Verwendung der P1-Transduktion durch Reparieren eines Isoleucins/Valins von auxotroph auf prototroph eingeführt. Schlussendlich wurde das phn(EcoB)-Operon in den Wirt mittels P1-Transduktion der E.-coli-phn-Gene eingeführt.

[0200] Kompetente E.-coli-40G3-Zellen wurden mit pHGH4R mittels Standardtransformationsverfahren transformiert. Transformanten wurden ausgewählt und auf LB-Platten, die 20 mg/l Tetracyclin enthielten, gereinigt. Dieses Medium besaß die folgende Zusammensetzung: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid und 20 mg/l Tetracyclin-HCl.

[0201] Ein 10-l-Fermenter-Inokulum wurde zuerst durch Impfen einer Zweiliter-Schüttelflasche hergestellt, enthaltend etwa 500 ml eines sterilen LB-Mediums, enthaltend 5 mg/l Tetracyclin mit frisch aufgetauten 0,5 ml Stammkultur. Diese Flasche wurde bei 35-39 °C 8 Stunden lang inkubiert und in einen 10-Liter-Fermenter transferiert, der das Produktionsmedium in dem Bereich von jenem enthielt, der unten stehend beschrieben ist.

Bestandteil	Menge/Liter
Glukose*	250-350 g
Ammoniumsulfat	3-8 g
Ammoniumhydroxid	je nach Bedarf, um den pH von 7,2 bis 7,4 zu kontrollieren
Natriumphosphat, monobasisches Dihydrat	1-2 g
Kaliumphosphat, dibasisch	2-4 g
Natriumcitrat, Dihydrat	0,5-1,5 g
Kaliumchlorid	1-2,5 g
25 % UCON LB625	0,1-0,2 ml anfänglich sowie nach Bedarf, um die Schaumbildung zu kontrollieren
Magnesiumsulfat, Heptahydrat	1-3 g
Tetracyclin-NCI	5-20 mg
Hycase SF**	5-20 g
NZ-Amin-YT	5-25 g
Isoleucin	0-10 g
Methionin	0-1 g
Eisen(III)-chlorid, Heptahydrat	10-30 mg
Zinksulfat, Heptahydrat	2-5 mg
Bestandteil	Menge/Liter
Kobaltchlorid, Hexahydrat	2-5 mg
Natriummolybdat, Dihydrat	2-5 mg
Kupfer(II)-sulfat, Pentahydrat	2-5 mg
Borsäure	0,5-2 mg
Mangansulfat, Monohydrat	1-3 mg
Methylphosphonat	1,5-2,5 g

* 1-5 g/l Glukose wurde anfänglich zu der Kultur hinzugefügt. Der Rest wurde der Kultur während der Ferment-

tation zugegeben.

** Hycase SF wurde während der Fermentation zugegeben.

[0202] Die 10-Liter-Kultur wurde bei 35-39 °C bei einem pH von 7,2-7,4 42-48 Stunden lang wachsen gelassen. Die Rührgeschwindigkeit wurde bei 650-1000 Umdrehungen pro Minute festgelegt und die Belüftungsrate bei 0,7-1,5 Volumeneinheiten Luft pro Volumeneinheit Kultur pro Minute.

[0203] Die 10-l-Kultur wurde mit kontinuierlicher Glukosezufuhr während der Fermentation wachsen gelassen. Die Produktion von hGH trat auf, nachdem das Phosphat im Medium aufgebraucht war.

Solubilisierung und wässrige Extraktion des menschlichen Wachstumshormons

[0204] Das hGH aus der oben genannten Fermentationsnährlösung wurde durch Hinzufügen von 240 g Harnstoff, 20 ml 1 M Glycin (pH 10) und 10 ml 1 M Dithiothreit (DTT) zu 1 l Fermentationsnährlösung solubilisiert, die in einer 2-l-Flasche enthalten war. Der pH des resultierenden Gemisches wurde durch die Addition von 1 N NaOH auf einen pH von 10 eingestellt. Während der Inkubation wurde das Gemisch kontinuierlich mit einem untergetauchten, motorgesteuerten Rührwerk gerührt, und der Kopfraum wurde mit Stickstoff gespült. Nach 2 Stunden Inkubation wurde ein aliquoter Teil gesammelt, zentrifugiert, um Feststoffe sedimentieren zu lassen, und der Überstand wurde auf den hGH-Gehalt getestet. Eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse zeigte, dass 31 % des gesamten hGH im Zentrifugierungsüberstand zu finden war.

[0205] hGH wurde anschließend durch das Hinzufügen von 308 g PEG-8000 und 103 g Na₂SO₄ zu dem Solubilisierungsgemisch extrahiert. Das resultierende Phasensystem wurde mit kontinuierlichem Umrühren und Stickstoffspülungen eine zusätzliche Stunde lang inkubiert. Eine Inspektion einer zentrifugierten 14,5-ml-Aliquote des Phasensystems zeigte, dass es 11,2 ml klare, leichte Phase enthielt und 3,3 ml schwere Phase, die Feststoffe enthielt. Nach der Inkubation wurde das Phasensystem zwischen zwei 1-l-Zentrifugenflaschen aufgeteilt und zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Das Dekantieren der getrennten Phasen führte zu 1,2 l klarer leichter Phase. Eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse zeigte, dass die leichte Phase 82 % des im Solubilisierungsüberstand enthaltenen hGH enthielt.

[0206] hGH wurde aus der isolierten leichten Phase durch Einstellen auf einen pH von 4 präzipitiert. Ein aliquoter Teil der Präzipitat-Suspension wurde in ein verschlossenes 15-ml-Röhrchen platziert und mittels Zentrifugierung geklärt. Nach der Zentrifugierung wurde der klare Überstand in ein neues Röhrchen dekantiert, und das Pellet wurde auf 2,5 ml resuspendiert, und zwar in 6 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl (pH 9), 0,1 M DTT. Eine Umkehrphasen-HPLC-Analyse zeigte, dass das resuspendierte Pellet 92 % des hGH enthielt, das ursprünglich in der leichten Phase enthalten war, während der Überstand weniger als 1 % enthielt.

Umfaltung des menschlichen Wachstumshormons

[0207] Die leichte Phase, die nicht natives hGH enthielt, wurde unter Verwendung der oben beschriebenen Solubilisierung und des wässrigen Extraktionsverfahrens hergestellt. Umfaltungspuffer wurden in 15-ml-Polystyrol-Kulturröhrchen durch die Zugabe der geeigneten Mengen der folgenden trockenen Chemikalien hergestellt: Harnstoff, Guanidin-HCl, NaCl, Na₂SO₄ und analysenreines Ethanol. Jedes Röhrchen erhielt 0,1 ml einer 50X-Puffer-Stammlösung, die entweder 1 M Tris-HCl (pH 8), 25 µM CuCl₂ oder 1 M Glycin (pH 10), 25 µM CuCl₂ enthielt. Andere Chemikalien wurden hinzugefügt, um die angegebene Konzentration mit einem Endvolumen von 5 ml zu erreichen. Jedes Röhrchen, das Umfaltungspufferkomponenten enthielt, wurde mit gereinigtem Wasser auf ein Endvolumen von 4,5 ml gebracht.

[0208] Die hGH-Umfaltung wurde durch Verdünnen von 0,5 ml der leichten Phase, die reduziertes hGH enthielt, in die zuvor hergestellten Umfaltungspuffer begonnen, wodurch eine anfängliche hGH-Konzentration von etwa 0,05 mg/ml erreicht wurde. Die Röhrchen wurden verschlossen und horizontal auf einem Rundschtüttler geschüttelt.

[0209] Jedes Röhrchen enthielt 5 ml Flüssigkeit und 10 ml Luft. Die Umfaltung wurde für eine Zeitspanne von 12 Stunden ermöglicht, wonach Proben gesammelt wurden, mit einem Faktor von 2 in einen angesäuerten Puffer verdünnt wurden, der 50 mM Essigsäure (pH 3), 50 mM NaCl enthielt, und mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert wurden, um den Gehalt an korrekt gefaltetem hGH zu bestimmen.

[0210] Das Ziel dieses Experiments ist es, die Wirkung der Umfaltungspufferzusammensetzung auf die Ausbeute von korrekt gefaltetem hGH zu zeigen, das während der Umfaltung erhalten wurde. Die folgenden As-

pekte der Umfaltungspufferzusammensetzung wurden untersucht: Salztyp und -konzentration (0,2 M Na₂SO₄, 0,5 M NaCl), Typ des chaotropen Agens und Konzentration (0,5, 4 M Harnstoff; oder 0,5, 2 M Guanidin-HCl), Lösungsmittelkonzentration (0,10 Vol.-% Ethanol) und Puffertyp und – pH (Tris-HCl, pH 8, Glycin, pH 10). Die durch ausgewählte Kombinationen dieser Komponenten erhaltenen Ausbeutewerte sind in Tabelle VIII dargestellt. Eine Inspektion zeigt, dass die höchste Ausbeute an korrekt gefaltetem hGH durch eine Umfaltung unter den folgenden Bedingungen erreicht wurde: 20 mM Glycin (pH 10), 0,5 M Guanidin, 0,5 M NaCl, 10 Vol.-% Ethanol und 0,5 µM CuCl₂ (Probe Nr. 5).

TABELLE VIII

Wirkung der Lösungsbedingungen auf die hGH-Umfaltungsausbeute

<u>Probennr.</u>	<u>NaCl</u> <u>(M)</u>	<u>Na₂SO₄</u> <u>(M)</u>	<u>Gdn*</u> <u>(M)</u>	<u>Harnstoff</u> <u>(M)</u>	<u>EtOH</u> <u>(Vol.-%)</u>	<u>pH</u>	<u>Ausbeute</u> <u>(%)</u>
1	0,5	0	0	0,5	0	10	65
2	0	0,2	0	0,5	10	8	61
3	0,5	0	0	4	10	8	71
4	0	0,2	0	4	0	10	65
5	0,5	0	0,5	0	10	10	76
6	0	0,2	0,5	0	0	8	4
7	0,5	0	2	0	0	8	69
8	0	0,2	2	0	10	10	71

* Gdn = Guanidin.

[0211] Das in diesem Beispiel beschriebene Experiment wurde kreiert, um eine mehrfaktorielle statistische Analyse an korrekt gefalteten hGH-Ausbeute-Daten zu ermöglichen, um die Bedeutung aller einzelnen Faktoren zu bewerten. Die Resultate dieser statistischen Analyse sind in Tabelle IX gezeigt.

TABELLE IX

Durchschnittliche Ausbeute an korrekt gefaltetem hGH durch Umfaltungslösungs-Komponenten

A. Durch Salztyp und -menge

<u>Salz</u>	<u>Durchschnittliche Ausbeute hGH (%)</u>
0,5 M NaCl	66
0,2 M Na ₂ SO ₄	70

B. Durch den Typ des chaotropen Agens

<u>Typ des chaotropen Agens</u>	<u>Durchschnittliche Ausbeute hGH (%)</u>
Harnstoff	66
Guanidin (Gdn)	71

C. Durch die Menge des chaotropen Agens

<u>Menge des chaotropen Agens</u>	<u>Durchschnittliche Ausbeute hGH (%)</u>
0,5 M Harnstoff oder 0,5 M Gdn	68
4 M Harnstoff oder 2 M Gdn	69

D. Durch die Menge des Lösungsmittels

<u>[Ethanol] Vol.-%</u>	<u>Durchschnittliche Ausbeute hGH (%)</u>
0	67
10	70

E. Durch den pH

<u>pH</u>	<u>Durchschnittliche Ausbeute hGH (%)</u>
8	67
10	69

[0212] Die oben genannten Resultate zeigen, dass rekombinantes hGH durch Hinzufügen von chaotropem Mittel und Reduktionsmittel zu der alkalischen Fermentationsnährlösung solubilisiert werden kann und aus Zellen abgesondert werden kann (durchschnittliche Ausbeute von etwa 30 %). Höhere Ausbeutewerte können während der Solubilisierung erhalten werden, wenn die Zellen vor der Zugabe der Solubilisierungsmittel lysiert werden (Verbesserung der Ausbeute von etwa 50 %). Andere kleine Unterschiede während der Solubilisierung umfassen eine höhere Ausbeute mit Guanidin als mit Harnstoff (Verbesserung der Ausbeute von etwa 10 %) und eine höhere Ausbeute mit einer moderaten chaotropen Konzentration als mit einer niedrigen chaotropen Konzentration (etwa eine Verbesserung der Ausbeute von etwa 20 durch die Verwendung von 4 M anstatt von 2 M).

[0213] Das wässrige Extraktionsverfahren verlief beinahe identisch während der Trennung von nicht nativem hGH von Biomasse im Vergleich zu der Trennung von nicht nativem IGF-I von Biomasse. Der einzige Unterschied, der anzumerken ist, umfasst eine kleine Präferenz für eine höhere Konzentration des chaotropen Agens während der Extraktion (etwa eine Verbesserung der Ausbeute von etwa 5 % durch die Verwendung von 4 M Harnstoff anstatt von 2 M). Die Inklusion einer höheren Konzentration eines chaotropen Agens während der Extraktion beeinflusste die Konzentration von Polymer und Salz, die benötigt wurde, um ein Zweiphasen-System zu erzeugen, nicht signifikant, wobei in diesem das gewünschte nicht native Polypeptid in der leichten Phase angereichert ist und die Biomasse-Feststoffe sich in der schweren Phase absetzen. Gleichermaßen beeinflusste eine mechanische Lyse der Zellen vor der Solubilisierung die Leistung der wässrigen Extraktion nicht.

[0214] Zusammen genommen deuten diese Unterschiede im Allgemeinen darauf hin, dass das größere Protein hGH stärker denaturierende chaotrope Bedingungen für die Solubilisierung bevorzugt und weniger leicht aus den permeabilisierten Zellen abgesondert wird als das kleinere Protein IGF-I.

[0215] Abschließend ist zu sagen, dass die oben beschriebenen Resultate für hGH klar und deutlich zeigen, dass das beanspruchte Verfahren auf die Isolierung von nicht nativem hGH sowie IGF-I anwendbar ist. IGF-I und hGH sind im Wesentlichen sehr unterschiedliche Proteine, da sie sich in vielen ihrer Eigenschaften signifikant unterscheiden. Insbesondere besitzen sie verschiedene Aminosäuresequenzen, verschiedene Molekulargewichte, verschiedene Anzahlen und Muster an Disulfidbrücken und verschiedene isoelektrische Punkte. Trotz dieser Unterschiede zeigen IGF-I und hGH während ihrer extraktiven Trennung von Biomasse-Feststoffen durch das Verfahren dieser Erfindung ein sehr ähnliches Verhalten.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

- (i) ANMELDER: Genentech, Inc.
Builder, Stuart
Hart, Roger
Lester, Phillip
Reifsnyder, David
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Umfaltung von Polypeptiden
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: Genentech, Inc.
 - (B) STRASSE: 460 Point San Bruno Blvd
 - (C) STADT: South San Francisco
 - (D) BUNDESSTAAT: Kalifornien
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL: 94080
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) ART DES MEDIUMS: 5,25 Zoll, 360 Kb Floppy Disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patin (Genentech)
- (vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER:
 - (B) EINREICHDATUM:
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (vii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER: 08/110664
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 20. August 1993
- (viii) INFORMATIONEN ÜBER ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: Hasak, Janet E.
 - (B) REGISTRATIONSNUMMER: 28.616
 - (C) KENNZAHL/ZEICHEN: 804P1PCT
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
 - (A) TELEFON: 415/225-1896
 - (B) TELEFAX: 415/952-9881
 - (C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 1:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 485 Basen
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 1:

GAATTCATGA GATTTCTTC AATTTTACT GCAGTTTAT TCGCAGCATC 50
CTCCGCATTA GCTGCTCCAG TCAACACTAC AACAGAAGAT GAAACGGCAC 100
AAATTCCGGC TGAAGCTGTC ATCGGTTACT TAGATTTAGA AGGGGATTTTC 150
GATGTTGCTG TTTTGCCATT TTCCAACAGC ACAAATAACG GGTATTGTT 200
TATAAATACT ACTATTGCCA GCATTGCTGC TAAAGAAGAA GGGGTATCTT 250
TGGATAAAAAG AGGTCCGGAA ACTCTGTGCG GCGCTGAGCT GGTGACGCT 300
CTGCAGTTCG TATGTGGTGA TCGAGGCTTC TACTTCAACA AACCGACTGG 350
GTACGGATCC TCCTCTCGTC GTGCTCCGCA AACCGGCATC GTTGATGAAT 400
GCTGTTTTCG GTCCTGTGAC CTTCCCGTC TGGAAATGTA CTGCGCTCCG 450
CTGAAACCGG CTAAGTCTGC ATAGTCGACG AATTC 485

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 2:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 30 Basen
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 2:

CATGGCCGGT CCGGAAACTC TGTGCGGCGC 30

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 22 Basen
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 3:

CGGCCAGGCC TTTGAGACAC GC 22

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 4:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 51 Basen
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 4:

CATGGCCGGT CCCGAAACTC TGTGCGGTGC TGAAGTGGTT GACGCTCTGC 50

A 51

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 43 Basen
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 5:

CGGCCAGGGC TTTGAGACAC GCCACGACTT GACCAACTGC GAG 43

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 6:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basen
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 6:

CATGGCCTCC CCATATTC 18

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 7:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 18 Basen
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 7:

CGGAGGGGTA TAAGGAGC 18

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 8:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 67 Basen
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 8:

TCGTCGTGCT CCCAGACTG GTATTGTTGA CGAATGCTGC TTTCGTTCTT 50

GCGACCTGCG TCGTCTG 67

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID NR. 9:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 70 Basen
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGBESCHAFFENHEIT: einfach
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID NR. 9:

AGAACGCTGG ACGCAGCAGA CCTTTACATA ACGCGAGGGG ACTTTGGGCG 50

ATTTAGACGA ATCTTCGAGG 70

Patentansprüche

1. Verfahren zum inkorrekten Reaktivieren von in Wirtszellen enthaltenem, gefaltetem IGF-I, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (a) das Isolieren des IGF-I aus den Wirtszellen;
 (b) das Halten des IGF-I in einem alkalischen Puffer, der ein chaotropes Mittel und ein Reduktionsmittel in einer Konzentration umfasst, die für eine Solubilisierung ausreicht; und
 (c) das Inkubieren des solubilisierten IGF-I in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 15 mg/ml in einem Faltungspuffer mit pH 7 bis 12, der etwa 5 bis 40 Vol.-% eines alkoholischen oder polaren aprotischen Lösungsmittels, etwa 0,2 bis 3 M eines Erdalkalimetall-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalzes, etwa 0,1 bis 9 M eines chaotropen Mittels und etwa 0,1 bis 15 μ M eines Kupfer- oder Mangansalzes umfasst, worin eine Sauerstoffquelle eingeführt ist, so dass während der Inkubation eine Umfaltung des IGF-I erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das chaotrope Mittel aus Natriumthiocyanat, Guanidinhydrochlorid und Harnstoff ausgewählt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin der Faltungspuffer zusätzlich ein Reduktionsmittel umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das chaotrope Mittel in Schritt (c) Harnstoff in einer Konzentration von etwa 1 bis 3 M ist und das Reduktionsmittel eines von Dithiothreitol und Cystein in einer Konzentration von etwa 1 bis 5 mM bei einem pH von etwa 8 bis 11 ist oder Guanidinhydrochlorid in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 0,5 M ist und das Reduktionsmittel Dithiothreitol oder Cystein in einer Konzentration von etwa 1 bis 5 mM bei einem pH von etwa 8 bis 11 ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Lösungsmittel Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Propanol, t-Butanol, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, N-Methylpyrrolidon, Tetrahydrofuran, Dioxan, Glycerin, Acetonitril oder Propylenglykol ist und/oder das Erdalkalimetall-, Alkalimetall- oder Ammoniumsalz NaCl, Na_2SO_4 , MgCl_2 , MgSO_4 , NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist und das Kupfer- oder Mangansalz ein Chlorid oder Sulfat ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Faltungspuffer Glycin in einer Konzentration von etwa 20 mM mit einem pH von etwa 10 bis 11 ist und etwa 20 % Ethanol, etwa 1 M NaCl, etwa 1 mM Dithiothreitol, etwa 2 M Harnstoff und etwa 0,01-0,5 μ M Kupferchlorid umfasst.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin der IGF-I aus prokaryotischen Zellen isoliert wird.
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der pH in Schritt (b) im Bereich von 8 bis 11 liegt.
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Umfaltung in Schritt (c) bei 25 °C bis 37 °C erfolgt.
10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Puffer in Schritt (b) und/oder Schritt (c) aus CAPSO, AMP, CAPS, CHES, TRIS HCL und Glycin ausgewählt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin der Puffer eine Konzentration von etwa 20 mM und einen pH zwischen 8,5 und 11 aufweist.
12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Faltungspuffer in Schritt (c) einen Osmolyten, ausgewählt aus 0,25 bis 1 M Saccharose und 1 bis 4 M Glycerin, umfasst.
13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Polypeptid in Schritt (c) mit dem Umfaltungspuffer 10fach verdünnt wird.
14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Polypeptid in Schritt (c) gegen den Umfaltungspuffer dialysiert wird.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

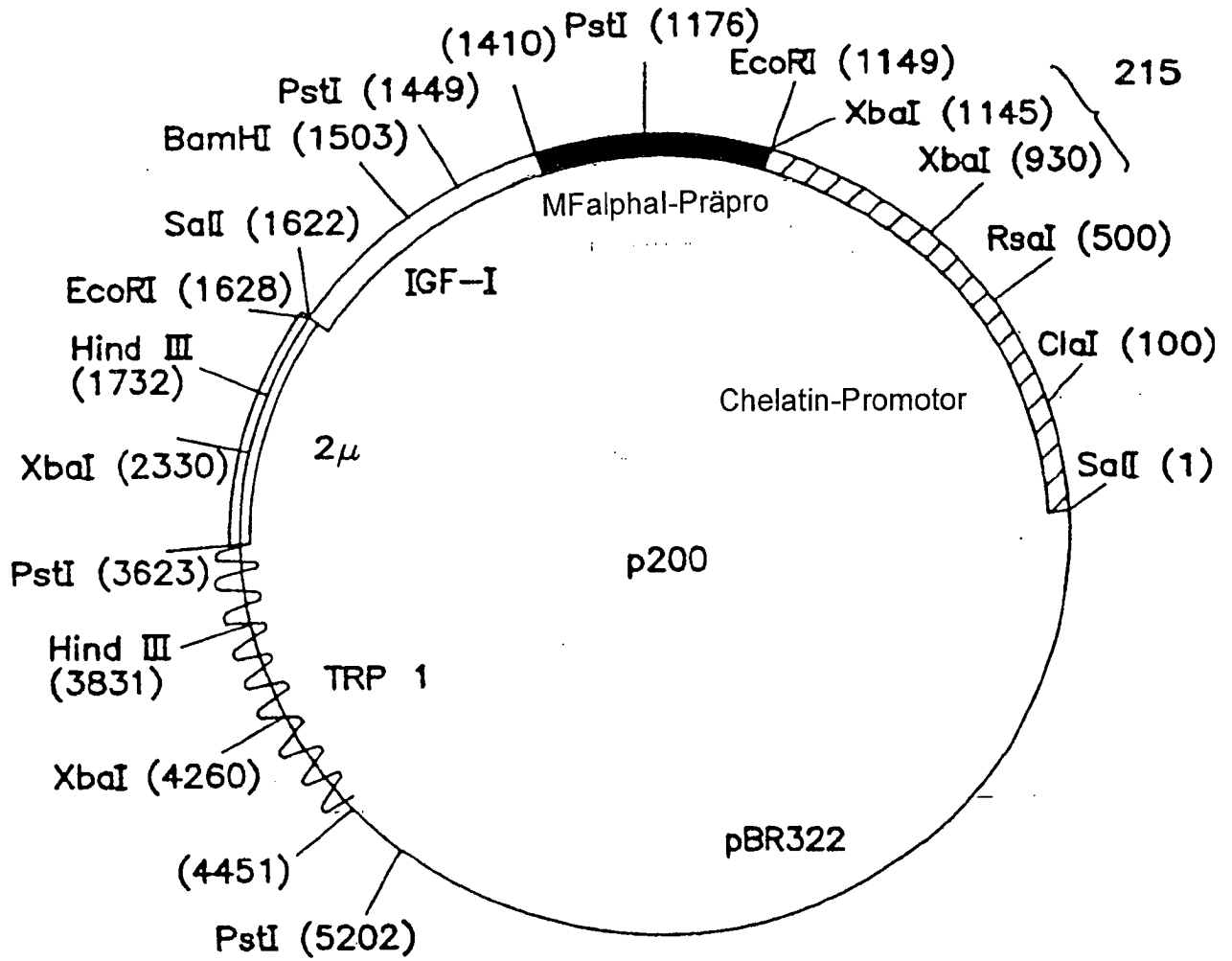


FIG. 1

FIG. 2

*Eco*RI (1149)
 5' - GAATTCATGAGATTCCTTCAATTTTACTGCAGTTTATTCCGAGCATCCCTCCGCATTAGC
 TGCTCCAGTCAACACTACAACAGAGATGAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTTCATCGGTT
 ACTTAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGG
 TTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAGAAGAAGGGTATCTTTGGATAA
 AAGAGGTCGGGAACTCTGTGCGGGCTGAGCTGGTTGACGGCTCTGCAGTTCGTATGTGGTGATC
 GAGGCTTCTACTTCAACAACCGACTGGGTACGGATCCCTCCTCGTGTCTCCGCAACCGGC
 ATCGTTGATGAATGCTGTTTTCCGGTCCGTGACCCTCCGCCGTGGAAATGTACTGCGCTCCGCT
 GAAACCGGCTAAGTCTGCATAGTCGACGAATTC-3'

*Hae*II
GCGGGCTGAGCTGGTTGACGGCTCTGCAGTTCGTATGTGGTGATC

*Pst*I
CTGCAGTTCGTATGTGGTGATC

*Bam*HI
TCCCTCCTCGTGTCTCCGCAACCGGC

*Sal*I *Eco*RI (1633)
TGACGAATTC-3'

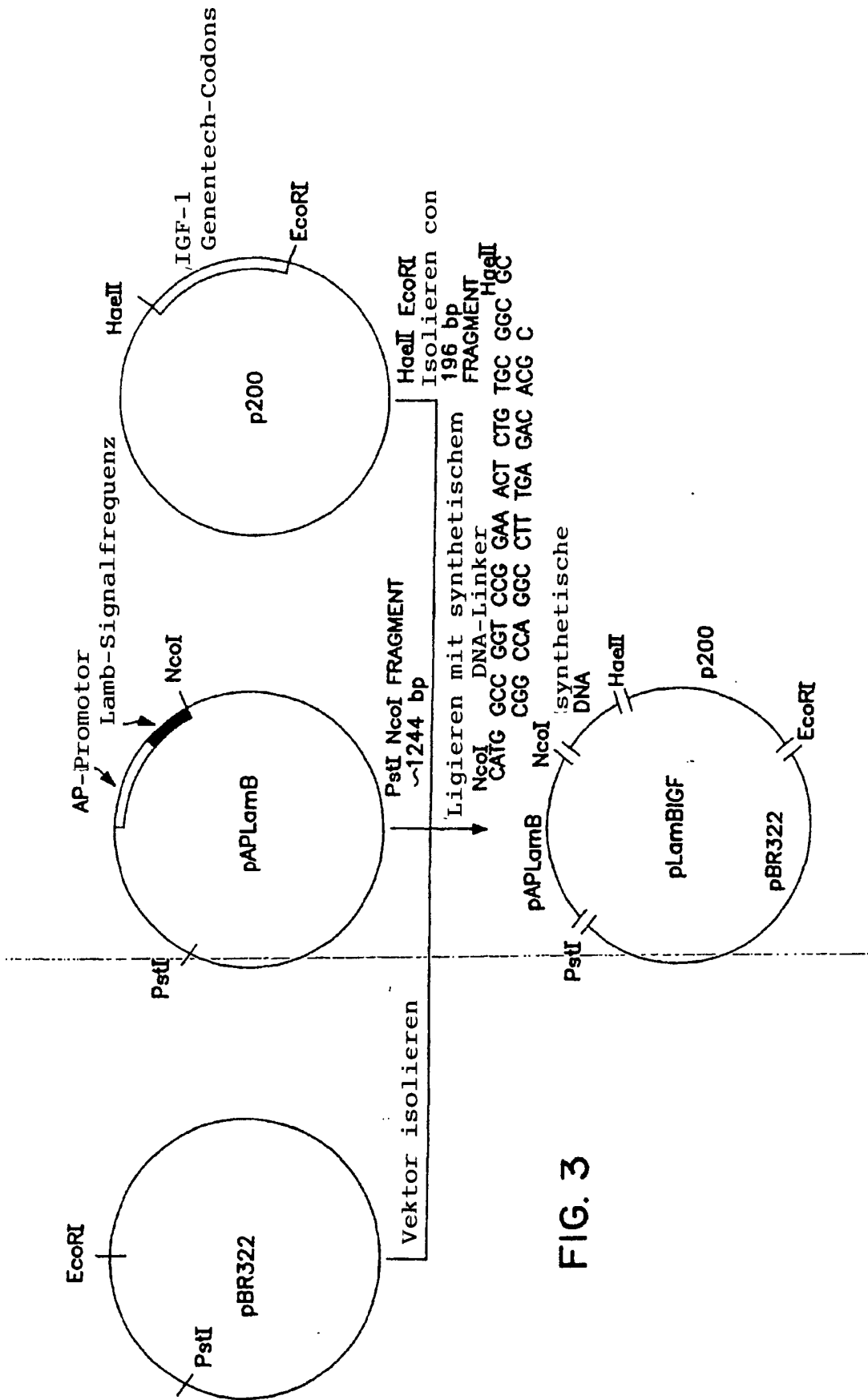


FIG. 3

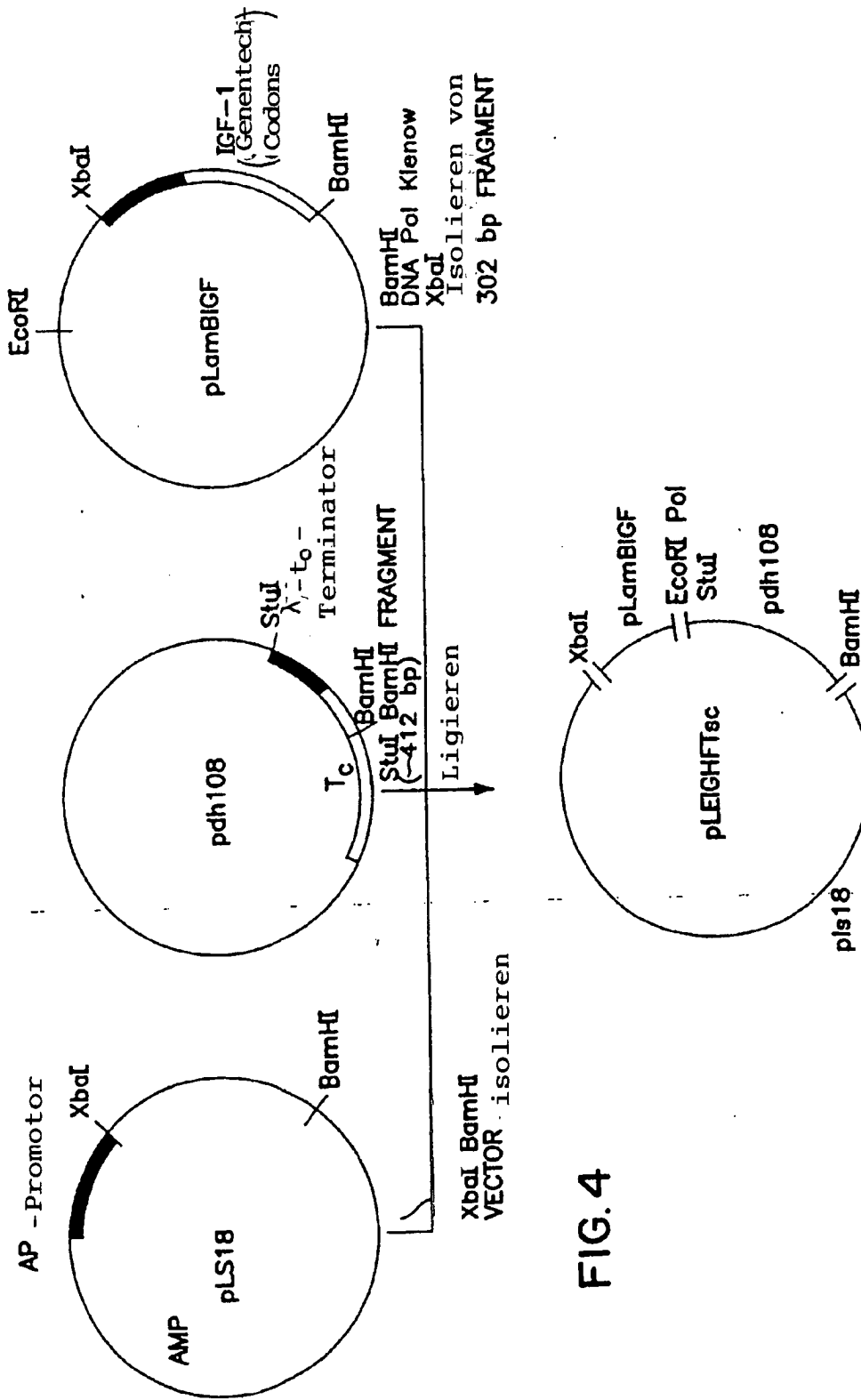


FIG. 4

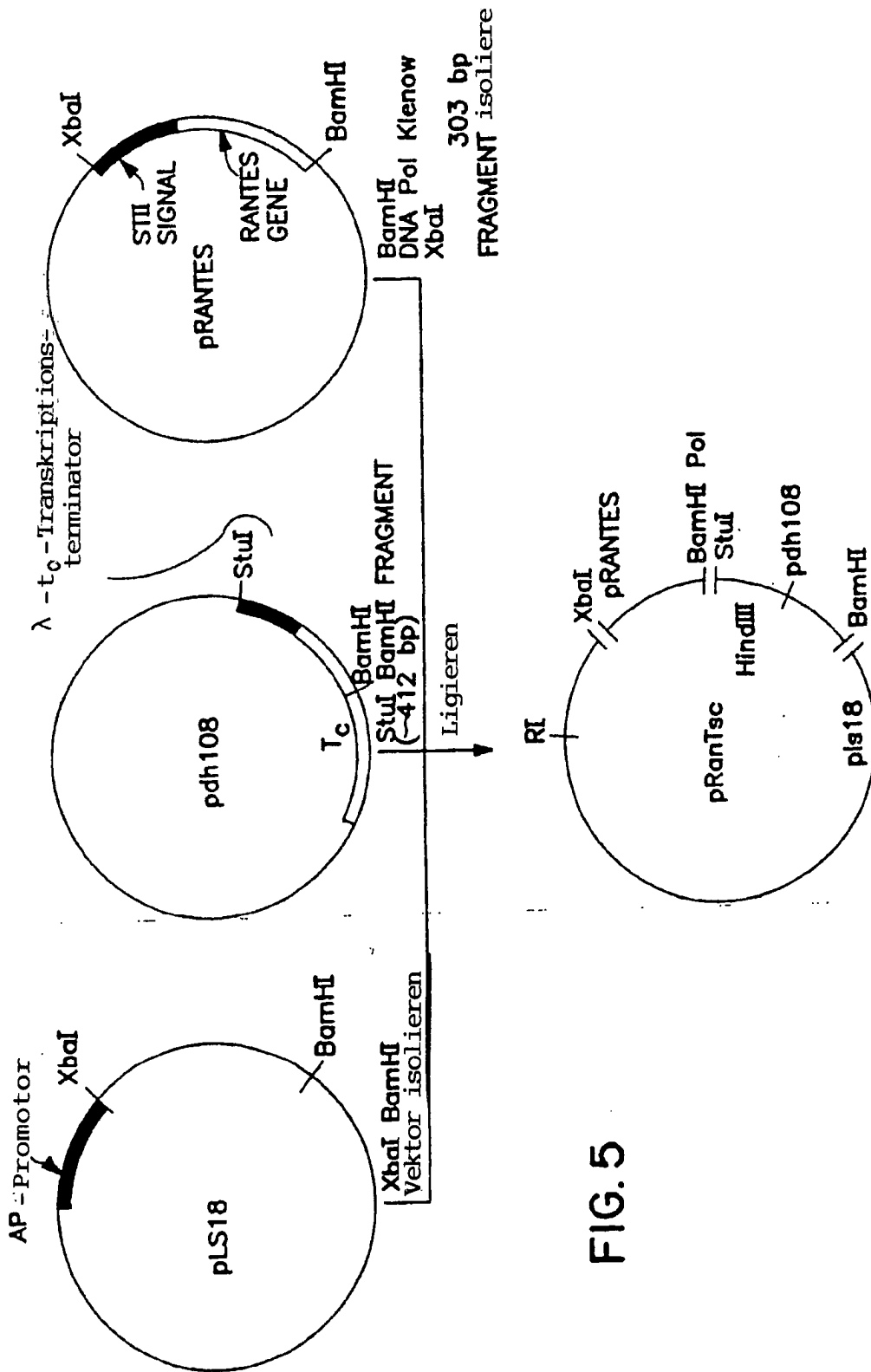


FIG. 5

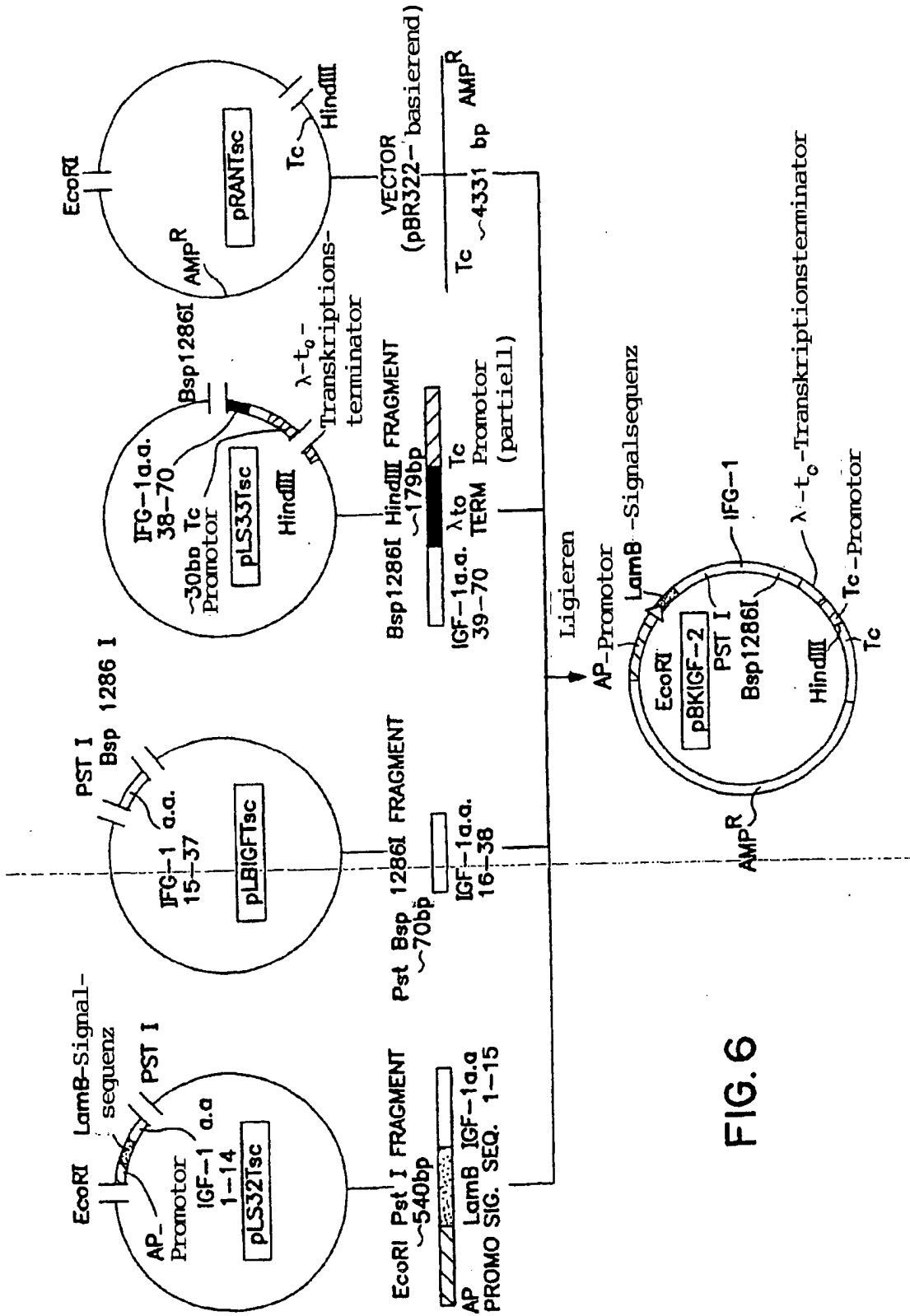


FIG. 6

NcoI IGF25 A & B PstI
 CATG GCC GGT CCC GAA ACT CTG TGC GGT GCT GAA CTG GTT GAC GCT CTG CA 51mer
 CCG CCA GGG CTT TGA GAC ACG CCA CGA CTT GAC CAA CTG CGA G 43mer

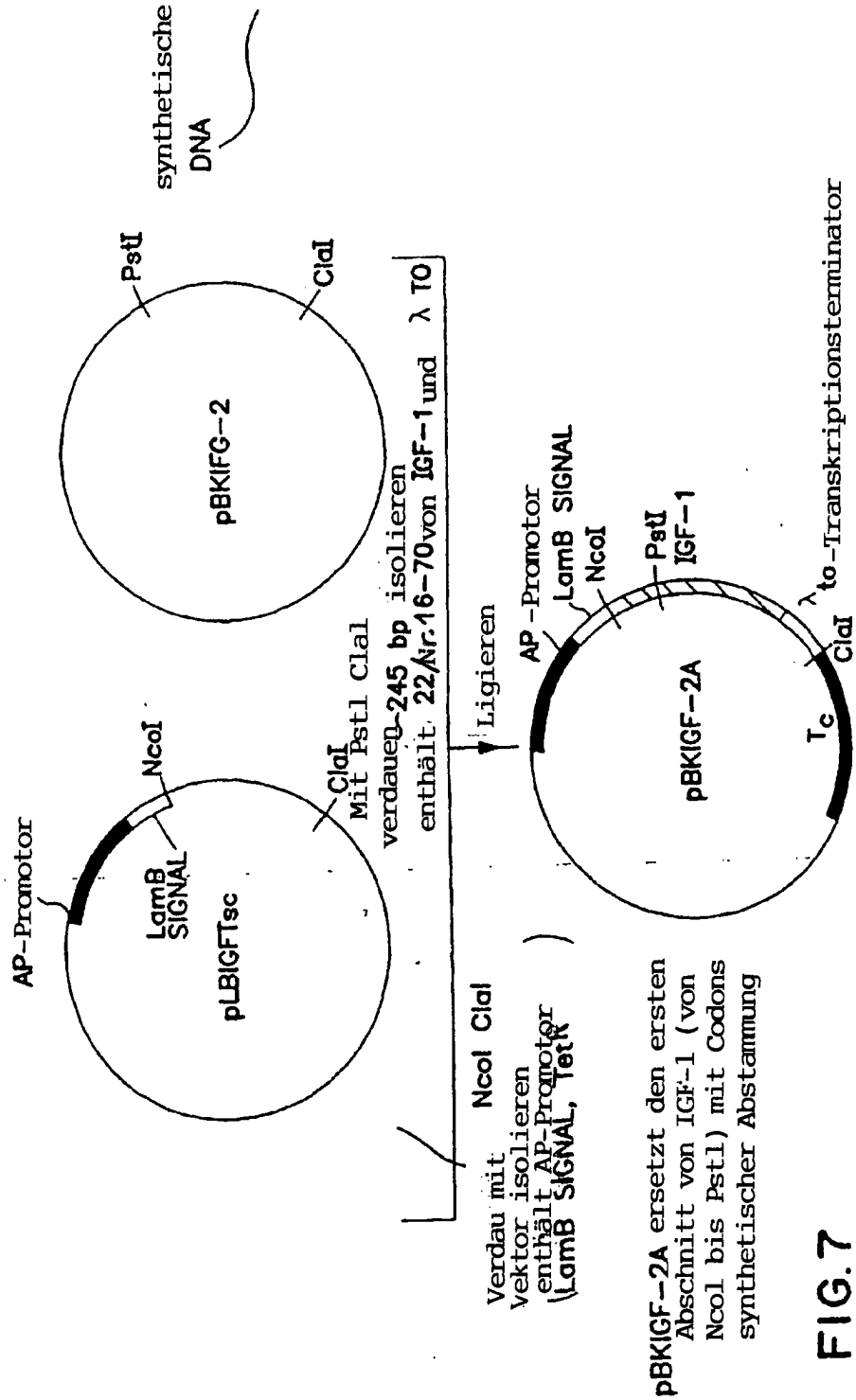


FIG. 7

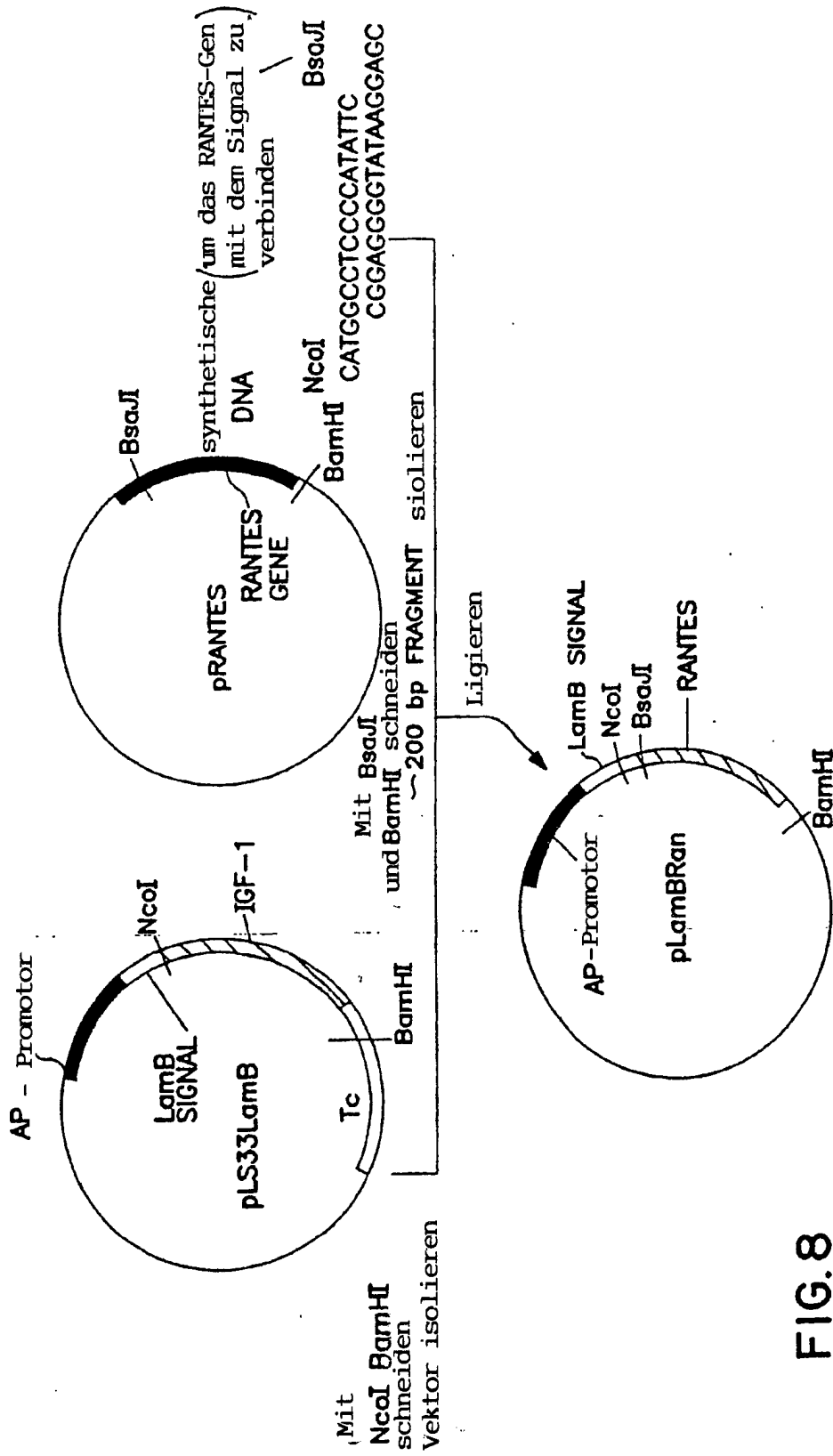


FIG. 8

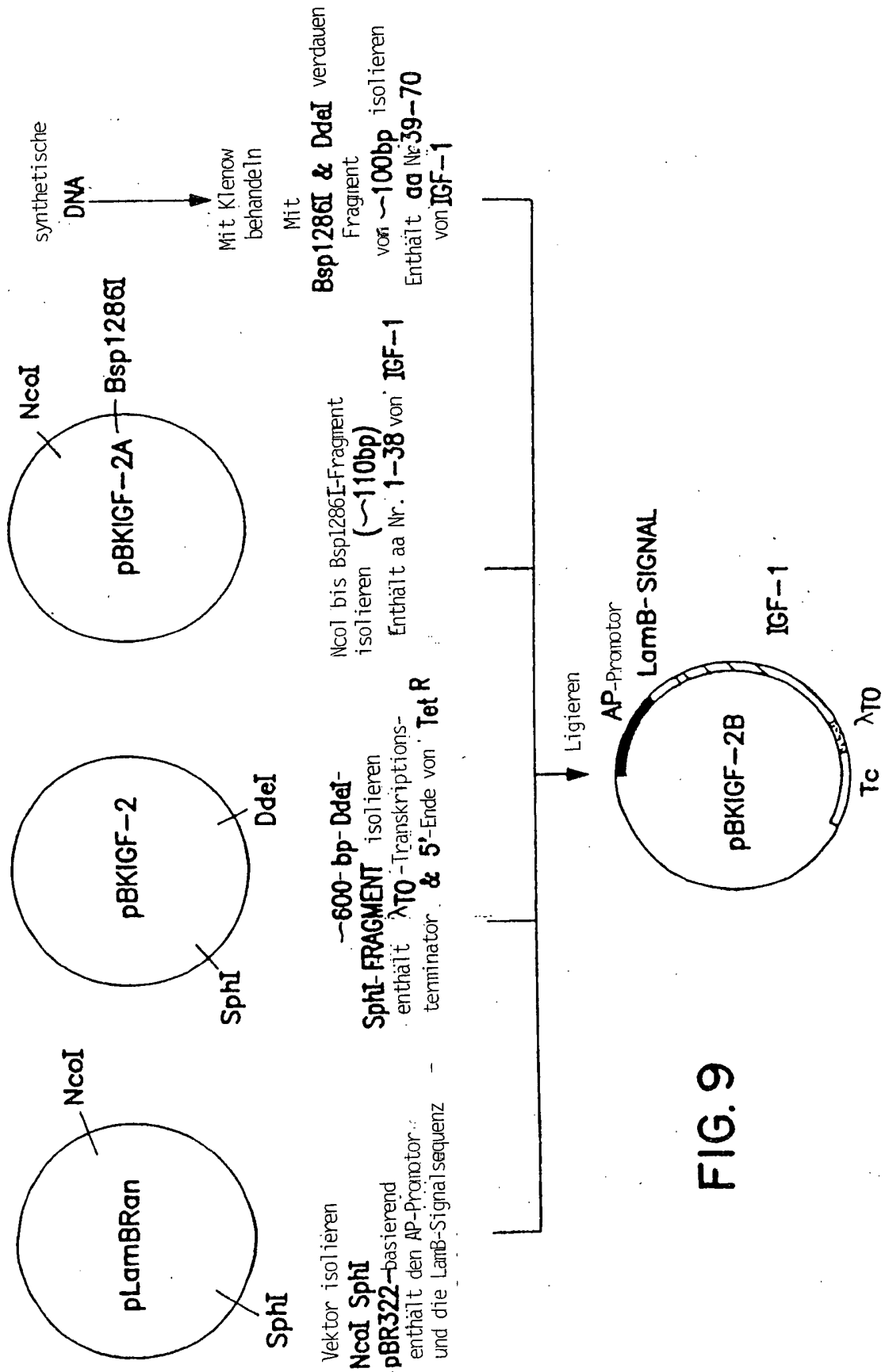


FIG. 9

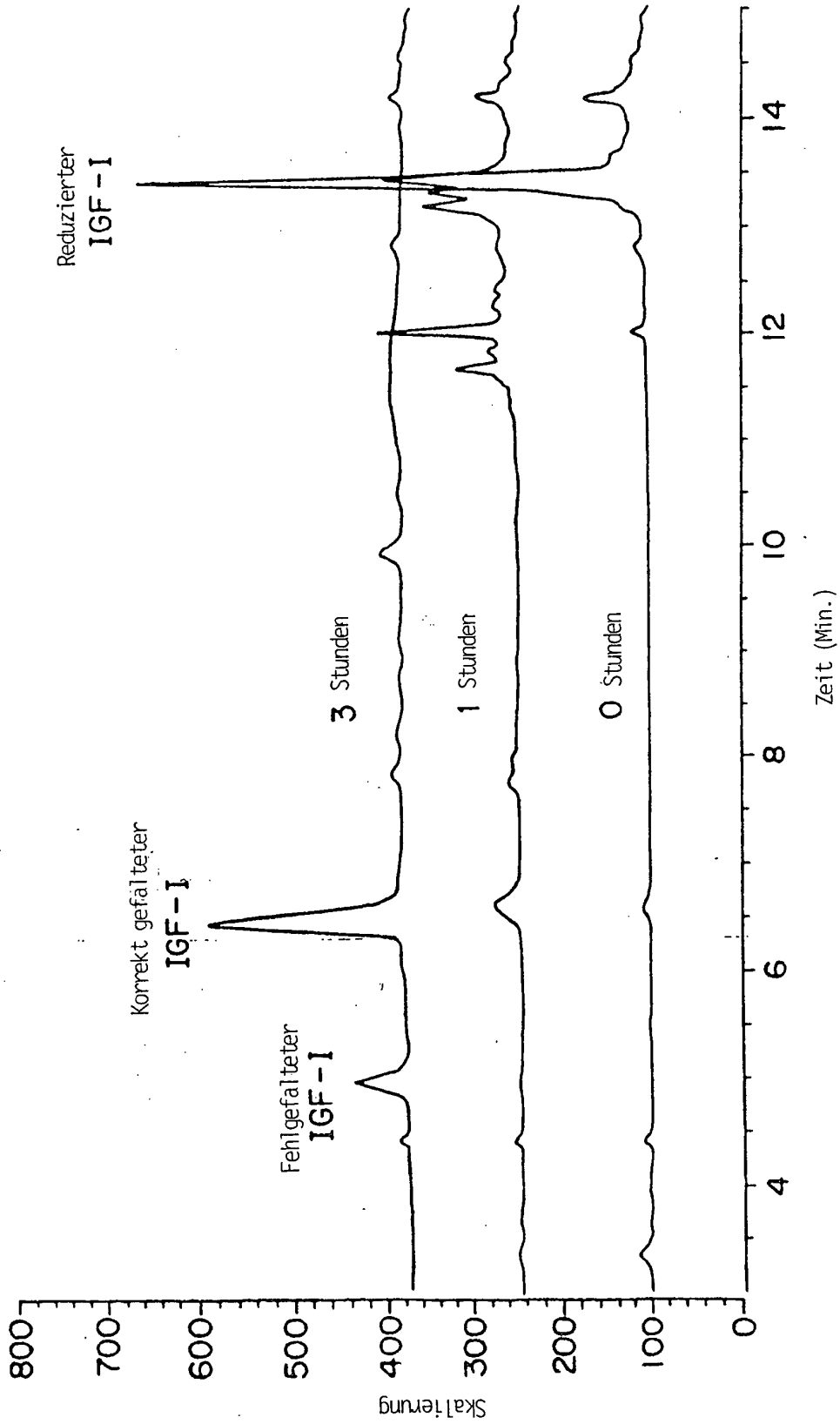


FIG.10

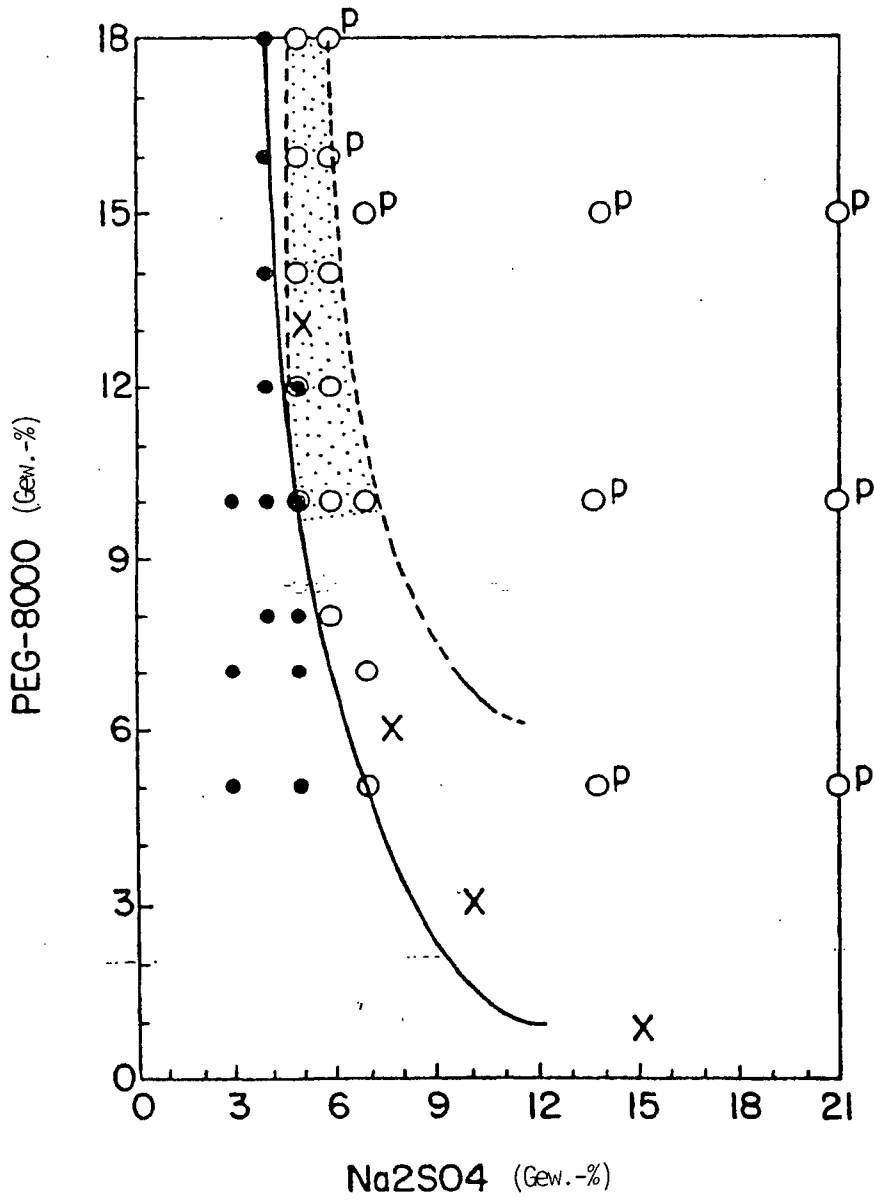


FIG. 11

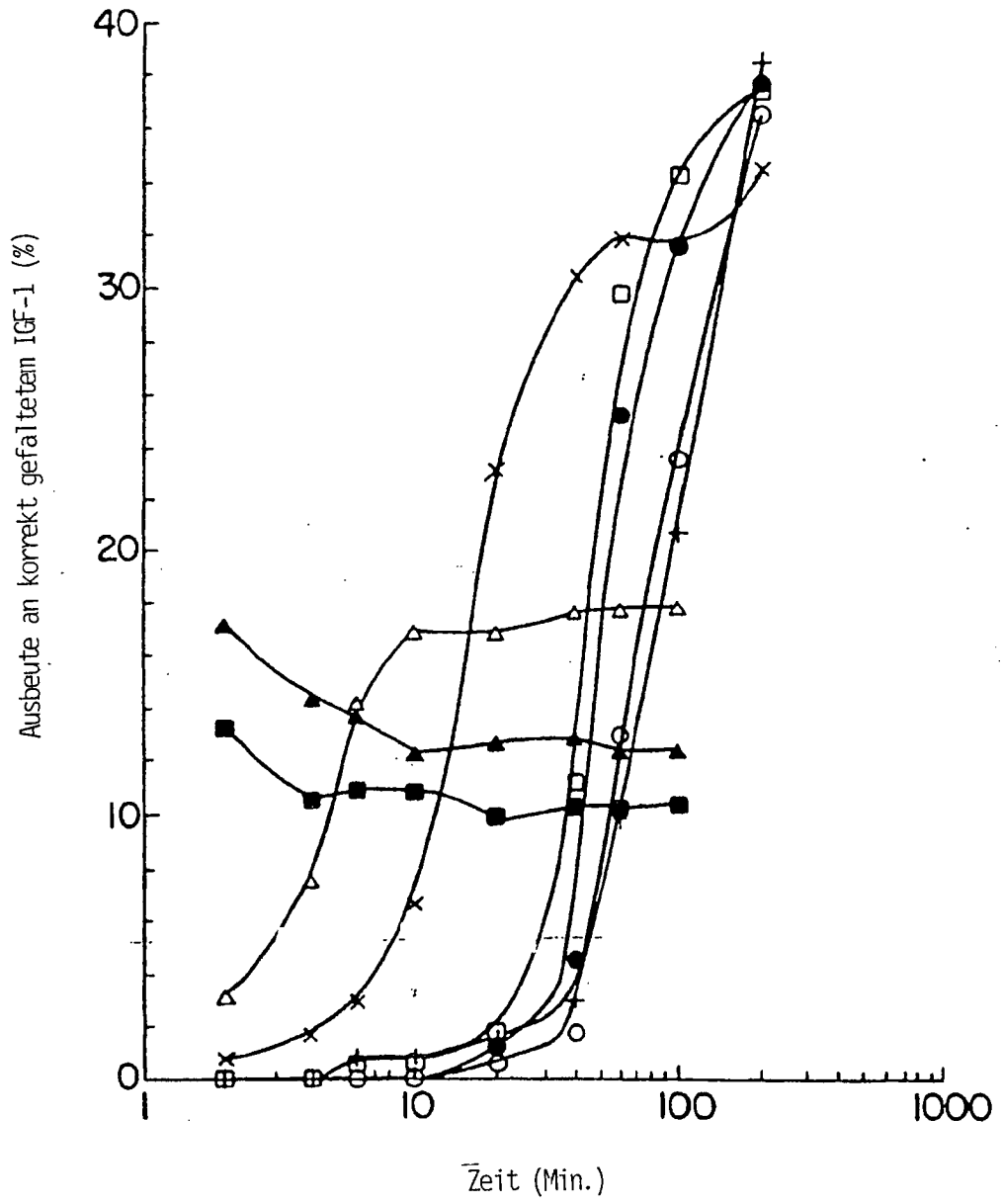


FIG. 12