

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁL MÁNYI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**209 313 B**

(21) A bejelentés száma: 3959/92  
(22) A bejelentés napja: 1991. 06. 13.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
538 636 1990. 06. 15. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 91/04045  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/19742

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 07 K 7/10**

**A 61 K 37/02**

(40) A közzététel napja: 1993. 08. 30.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1994. 04. 28. SZKV 94/04

(72) Feltalálók:

Hammond, Gerald S., East Orange, New Jersey (US)  
Le, Hung V., Rockaway, New Jersey (US)  
Nagabhushan, Tattanahalli L., Parsippany, New Jersey (US)  
Reichert, Paul, Montville, New Jersey (US)  
Trotta, Paul P., Secaucus, New Jersey (US)

(73) Szabadalmaz:

Schering Corp., Kenilworth, New Jersey (US)

(74) Képvisező:

S.B.G. és K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda,  
Budapest

### **(54) Eljárás kristályos interleukin-4 és ezt tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás kristályos interleukin-4 (IL-4) előállítására. A találmány szerint 5–60 mg/ml IL-4-et és valamilyen szulfát- vagy citrát-sót tartalmazó 5–7 pH-jú 40 mM foszfátpuffer-oldatot 5–25 °C hőmérsékleten 30–40 tömeg%-os ammónium-szulfát-

oldattal szemben inkubálnak 2–20 napig, amíg a betöményedő oldatból az IL-4 kristályosan kiválik. Az izolált kristályos IL-4-et adott esetben fémmel vagy egyéb komplexképzővel alkotott komplexként ismert módszerrel formázzák gyógyszerkészítménnyé.

A T-sejtből származó interleukin-4-et (IL-4) eredetileg olyan rágszáló (murine) faktorként írták le, amely kosztimulálhatja az aktivált B sejtek szaporodását [Howard et al., *J. Exp. Med.* 155, 914 (1982)]. Ezt követően bemutatták, hogy a rágszáló IL-4 különböző biológiai hatásokat képes kifejteni B sejteken [Paul et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 429 (1987); Noelle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6149 (1984); Roehm et al., *J. Exp. Med.*, 160, 679 (1984); Vitetta et al., *J. Exp. Med.*, 162, 1726 (1985); Coffman et al., *J. Immunol.*, 136, 4358 (1986); Coffman et al., *J. Immunol.*, 136, 949 (1986)] és más típusú sejteken, beleértve a T-sejteket [Mosmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5654 (1986); Fernandez-Botran et al., *J. Exp. Med.*, 164, 580 (1986); Hu-Li et al., *J. Exp. Med.*, 165, 157 (1987); Grabstein et al., *J. Immunol.*, 139, 1148 (1987); Zlotnick et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3856 (1987)], hematopoietikus progenitor sejteket [Rennick et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6889 (1987); Peschel et al., *Blood* 70, 254 (1987)] és hízősejteket (ld. Mosmann és munkatársai fentebb idézett közleményét).

A rágszáló (murine) IL-4-gyel való homológiára alapozva egy humán interleukin-4-et (huIL-4) kódoló cDNS-t klónoztak [Yokota et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5894 (1986)], és kifejezték mind emlős [Le et al., *J. Biol. Chem.*, 263, 10 817 (1988); Sonoda et al., *J. Biotechnology* 9, 61 (1988); Takebe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8, 466 (1988)], mind bakteriális gazdasejtekben [van Kimmenade et al., *Eur. J. Biochem.*, 173, 109 (1988)]. Ugyanúgy, mint a rágszáló (murine) IL-4, a rekombináns huIL-4 (rhuIL-4) is pleiotrop limfokin, amely sejtek különböző típusaira hat. Így például a rhuIL-4 indukálhatja mind az aktivált T, mind a B limfociták szaporodását [Spits et al., *J. Immunol.*, 139, 1142 (1987); DeFrance et al., *J. Immunol.*, 139, 1135 (1987)], fokozhatja a nagy hisztokompatibilitású antigének (major histocompatibility antigens) II osztályának és az IgE-re alacsony affinitású receptorok expresszióját B sejteken [Rousset et al., *J. Immunol.*, 140, 2625 (1988); DeFrance et al., *J. Exp. Med.*, 165, 1459 (1987)], és indukálhatja IgE és más immunglobulinok termelését [Pene et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6880 (1988)]. Az rhuIL-4-nek a B sejt eredetű krónikus limfocitás leukémia sejteknek az IL-2-től függő szaporodását gátló képességére enged következtetni egy B sejt neoplazmákban végzett klinikai alkalmazás [Karray et al., *J. Exp. Med.*, 168, 85 (1988)].

A tisztított rhuIL-4 milligrammos mennyiségeinek hozzáférhetősége tette lehetővé a protein szerkezeti vizsgálatainak és a protein szerkezete és funkciói közötti összefüggések vizsgálatainak megindítását. A találmány a kristályos interleukin-4 előállításához szükséges feltételeket közli. Továbbá vonatkozik magának a kristályos rhuIL-4-nek az előállítására is. A kristályok alkalmasak röntgendiffrakciós vizsgálatokra, és alkalmazhatók a rhuIL-4 tisztításánál és formázásánál is.

Tágabb értelemben véve a találmány vonatkozik a kristályos interleukin és hatóanyagként ezt tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány tárgyát képezi egy, az interleukin-4 kristályok előállítására szolgáló módszer, amely az interleukin-4-nek egy szulfát vagy citrát sóit tartalmazó 5–7 Ph-jú pufferolt vizes oldatból való kristályosításából áll.

A találmány szerinti kristályos interleukin-4 használható röntgenkristallográfiás analízishez és olyan körképek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek interleukin-4-gyel végzett kezelésre reagálnak.

A találmány szerinti eljárás szemléltetése céljából *E.coli*-ban kifejezzük a huIL-4 érett formáját. Más IL-4-ek, valamint rhuIL-4 más formái hasonlóképpen felhasználhatók. A sejt felülszóból származó rhuIL-4 tisztítását szokásos kromatográfiás módszerekkel végezzük (lásd Le és munkatársai előbb idézett munkáját). A függőcseppes gőzdiffúziós kísérleteket 24 vájatos sejtenyésztő lemezekben (Multiwell, Becton Dickinson & Co., Lincoln Park, NJ) végezzük. 20 mg/ml huIL-4-et, 15–20%-os telítettségnek megfelelő mennyiségű ammónium-szulfátot, 40 mM 6,0–7,0 pH-jú nátrium-foszfátot tartalmazó 6 µl-es cseppecskéket lógatunk a 24 vájatos sejtenyésztő lemezekkel szembefordított fedőlemezekről. Ezeket a cseppecskéket vagy 12 vagy 22 °C-on egyensúlyba hozzuk 30–40% telítettségnek megfelelő mennyiségű ammónium-szulfátot és 40 mM 6,0–7,0 pH-jú nátrium-foszfátot tartalmazó 1 ml oldattal. A szabályzott hőmérsékletű inkubálást 12 vagy 22 °C-ra beállított REVCO klímaszekrényekben végezzük.

A rhuIL-4 koncentrációját a különböző pufferokban spektrofometriásan határozzuk meg 278 nm-en 0,57/cm/mg/ml extinkciós koefficiens használva. A nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) Laemmli módszere szerint [Nature 227, 680 (1970)] végezzük. A fordított fázisú HPLC-t Rainin C4 oszlopon (4,6×250 mm; Dynamax, 300 Ångström) végezzük a kifejlesztett acetonitril lineáris gradienssel 0,1%-os trifluor-ecetsavban végezve. A humán perifériás vér limfociták alkalmazásával végzett T sejt szaporodási aktivitás meghatározást a korábban leírtak szerint hajtjuk végre (lásd Yokota és munkatársai előbb idézett közleményét). A röntgensugár vizsgálatokhoz nagy tetragonális kristályokat helyezünk üvegapillárisokba, és 22 °C-on fényképezzük egy precessziós kamerával egy Rigaku RU-300 forgó anódból kapott CuKα sugárzást használva. Teljes natív adatkészletet ugyanezen sugárforrás alkalmazásával gyűjtünk egy Nicolet X-100A terület detektoron.

Amint már az előbbieken szemléltetés céljából megállapítottuk, a találmányi leírásban szereplő kristályos humán interleukin-4 *E.coli*-ból származó rekombináns humán interleukin-4. A protein primer szerkezete (egyetűs aminosavróvidítéseket használva) a következő szekvenciával ábrázolható:

5 10 15 20 25 30  
 1 HKCDITLQEI IKTLSL TEQKTLCTELTVT  
 31 DIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHE  
 61 KDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNL  
 91 WGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIM  
 121 REKYSKCSS

Kicsapószerként ammónium-szulfátot használva a rhuIL-4 tűkként és nagy tetragonális kristályokként kristályosodik. A kristályosodás legjobban 34% ammónium-szulfátot tartalmazó 6,0 pH-jú 40 mM nátrium-foszfát pufferben érhető el 12 °C-on 21 napig végzett inkubálással. A tetragonális kristályokat észleljük nátrium-foszfátban 5,0-tól 7,0-ig terjedő pH-értékeknél és 30-tól 40%-ig terjedő ammónium-szulfát telítettségénél.

A kristályosítást 5-től 7-ig, előnyösen 5,5-től 6,5-ig terjedő pH-tartományban és legelőnyösebben körülbelül 6,0 pH-nál végezzük. A hőmérséklet körülbelül 5-től 25 °C-ig, előnyösen 12-től 22 °C-ig terjedő tartományba esik, és legelőnyösebb a körülbelül 12 °C. A proteinkoncentrációnak az egyensúlyi állapotban körülbelül 5-től 60 mg/ml-ig, előnyösen 30-tól 50 mg/ml-ig terjedő tartományba kell esnie, és legelőnyösebben körülbelül 40 mg/ml-nek kell lennie.

Az inkubálási idő 12–22 °C-on 2-től 20 napig változhat. Előre megállapítható, hogy az itt leírt kristályosítási módszerek más gazdasejtekből (például emlős sejtenyészetből, élesztőből, rovarokból és egyéb sejtenyészetekből) származó rhuIL-4 vagy természetes forrásokból (például humán perifériás vér limfocitákból vagy konstitutíven huIL-4-et termelő humán sejtvonalakból) származó huIL-4 kristályosítására is használhatók lesznek. Az is előre megjósolható, hogy a módszer más fajokból származó homológ interleukin-4 proteineknel is alkalmazható lesz.

A függő cseppecskékből izoláljuk a rhuIL-4-et, és alaposan mossuk 55% ammónium-szulfátot tartalmazó 6,6 pH-jú 40 mM foszfátpufferral szobahőmérsékleten (22–25 °C). A kristályokat újraoldjuk 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó 7,4 pH-jú 20 mM nátrium-foszfát-pufferban. Az oldott kristályok T sejt szaporodást kiváltó hatást fejtenek ki ( $2,0 \times 10^7$  egység/mg), ami azonos a kontroll rhuIL-4 minta hatásával, amely minta nem lett kristályosítva. SDS-PAGE-nek alávetve az újraoldott kristályos rhuIL-4 elektroforetikus migrációja azonos a kontroll mintáéval. Hasonlóképpen, az újraoldott kristályok HPLC elúciós képe megkülönböztethetetlen a kontroll minta elúciós képétől. Nem történik semmiféle protein degradáció 22 °C-on végzett hosszú időtartamú inkubáció eredményeképpen. Még fontosabb, hogy a kristályosítási eljárást követően fiziológias pufferoldatban való újraoldással nem észlelhető az rhuIL-4 T sejt szaporodást serkentő hatásának semmiféle károsodása.

A röntgensugár-diffrakciós adatokat kezdetben a területi detektor alkalmazásával 2,7 Å felbontásig gyűjtöttük. Az oszcillációs keretek fedése 0,25 volt, és 10 percig mértünk. Az intenzitás adatok indexelését és integrálását a XENGEN processing programok [Howard et al., J. Appl. Crystallogr., 20, 383 (1987)] alkal-

mazásával végeztük. Az adatok a tetragonális rendszerbe illettek;  $a = 92,1$  (2),  $b = 92,1$  (7) és  $c = 46,5$  (1) Å. A tércsoport vagy  $P_{4,2,2}$  vagy  $P_{4,2,1}$ .

Az interleukin ezt követő röntgensugár precessziós fényképei megerősítették a tércsoport és egységcella paramétereit. A tetragonális kristályok stabilak röntgensugarakkal szemben, és szobahőmérsékleten legalább öt napig adnak diffrakciót, és legalább 2,7 Å felbontásig szórnak.

Nagy méretű kristályosítási műveletek a gőzdiffúzióval egyenértékű módszerekkel, például dialízissal és ultraszűrőssel hajthatók végre. A függőcseppekes kísérletből kapott oltókristályok használhatók a nagy mértékben végzett kristályosítás gyorsítására, ha már megállapítottuk az optimális körülmények beállítását. Bár kicsapószerként az ammónium-szulfát használata előnyös, helyettesíthető más szokásos szulfát- és citrát-sókkal, például nátrium-, kálium-, kalcium- vagy magnézium-szulfáttal, nátrium-citráttal és másokkal (McPherson, Preparation and Analysis of Protein Crystals, 1982, John Wiley & Sons, New York, New York). A rhuIL-4 nagy mértékben végzett kristályosítása klinikai gyártásban végső tisztítási lépésként és/vagy koncentrálnálási lépésként vezethető be. Az rhuIL-4 hatóanyag kristályos formában való hosszú ideig tartó tárolhatósága igen kívánatos a kristályoknak a tartósítószerrel készített oldatban tárolt rhuIL-4-hez viszonyított jelentősen megnőtt stabilitása miatt.

A leírt módszerrel előállított kristályok különösen előnyös formák gyógyszer dózisformák készítéséhez. A kristályok használhatók például alapként egy in vivo lassú hatóanyagkibocsátású rhuIL-4 formához. Úgy véljük, hogy fémek (például cink vagy vas) és huIL-4 komplexei képezhetők, és ezt követően kristályosíthatók. Ezen komplexek kristályai szintén használhatók megfelelő gyógyszerészeti segédanyagokat tartalmazó lassú hatóanyagkibocsátású protein-készítményekben. Hasonló lassú hatóanyagkibocsátású protein-készítményekre példaként a cink-inzulin kristályos komplex (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985., Gennaro, A. R., Ed., Mack Publishing Co., Fasten, Pennsylvania, 974–976. old.) és a cink-inzulin-protamin kristályos komplex (Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia, 1989, Siting, M., Ed., 820–821. old.) említhető.

A találmány szerinti kristályos interleukin-4-et tartalmazó lassú hatóanyagkibocsátású gyógyszerkészítmények az ilyen interleukin-4 valamilyen fém és/vagy protein komplexképző szerrel való összekeverésével állíthatók elő a fentebb leírtak szerint.

A találmányt részletesebben a következő példákkal szemléltetjük. Kiindulási anyagként bakteriálisan kifejezett, tisztított interleukin-4-et (a továbbiakban IL-4) használunk.

### 1. példa

Kristályos IL-4 előállítása függőcseppes gőzdiffúziós módszerrel.

20 mg/ml koncentrációjú, 7 pH-jú IL-4 oldatot készítünk 40 mM nátrium-foszfátot és 20 tömeg% ammónium-szulfátot tartalmazó vizes oldatban oldva. (A koncentrációt spektrofotometriásan határozzuk meg 278 nm-nél 0,57/cm/mg/ml extinkciós koefficiens használva.) Egy szilikonozott fedőlapra 6 µl-es cseppet csepegtetünk, majd a fedőlapot megfordítjuk, és egy 24 vájatos szövettenyésztő lemezre tesszük úgy, hogy az IL-4-et tartalmazó cseppecske a fedőlapról a szövettenyésztő lemez vájatában levő ammónium-szulfát-oldat felé lógjon. A vájatban levő ammónium-szulfát-oldat koncentrációja 40 tömeg%, és az oldat pH-ját 37 mM nátrium-foszfát puffer tartja 6,9 értéken. Az egész kristályosító készüléket egy 22 °C-ra temperált REVCO® klímakamrában tartjuk. A kristályok a 4. napon jelennek meg.

### 2. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő az 1. példában leírt módon, de azzal az eltéréssel, hogy 10 mg/ml koncentrációjú IL-4 oldatot csepegtetünk a fedőlemezre, és a szövettenyésztő lemez vájatába 35 tömeg%-os ammónium-szulfát-oldatot töltünk, amelynek pH-ját 35 mM nátrium-foszfát puffer tartja 6,5 értéken. A kristályok a 7. napon jelennek meg.

### 3. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő az 1. példában leírt módon, de azzal az eltéréssel, hogy 40 mg/ml koncentrációjú IL-4 oldatot csepegtetünk a fedőlemezre, és a szövettenyésztő lemez vájatába 35 tömeg%-os ammónium-szulfát-oldatot töltünk, amelynek pH-ját 37 mM nátrium-foszfát puffer tartja 6,8 értéken. A kristályok a 4. napon jelennek meg.

### 4. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő a 3. példa szerint, de azzal az eltéréssel, hogy a klímakamra hőmérsékletét 12 °C-on tartjuk. A kristályok a 7. napon jelennek meg.

### 5. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő a 4. példában leírt módon, de azzal az eltéréssel, hogy a szövettenyésztő lemez vájatába 34 tömeg%-os ammónium-szulfát-oldatot töltünk, amelynek pH-ját 6,7 értéken tartja a nátrium-foszfát puffer. A kristályok a 7. napon jelennek meg.

### 6. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő a 4. példában leírt módon, de azzal az eltéréssel, hogy a szövettenyésztő lemez vájatába 39 tömeg%-os ammónium-szulfát-oldatot töltünk, amelynek pH-ját 6,6 értéken tartja a nátrium-foszfát puffer. A kristályok a 7. napon jelennek meg.

### 7. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő a 4. példában leírt módon, de azzal az eltéréssel, hogy a szövettenyésztő lemez vájatába 36 tömeg%-os ammónium-szulfát-oldatot töltünk, amelynek pH-ját 6,5 értéken tartja a nátrium-foszfát puffer. A kristályok a 7. napon jelennek meg.

### 8. példa

IL-4 kristályokat állítunk elő a 4. példában leírt módon, de azzal az eltéréssel, hogy a szövettenyésztő lemez vájatába 36 tömeg%-os ammónium-szulfát-oldatot töltünk, amelynek pH-ját 6,4 értéken tartjuk nátrium-foszfát pufferrel. A kristályok 7. napon jelennek meg.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás kristályos interleukin-4 előállítására, *azzal jellemezve*, hogy interleukin-4 valamilyen szulfát- vagy citrát-só oldatával készített 5–60 mg/ml koncentrációjú, 5–7 pH-jú pufferolt vizes oldatát 30–40 tömeg% koncentrációjú vizes ammónium-szulfát oldattal szemben 5 °C és 25 °C közötti hőmérsékleten 2–20 napig inkubáljuk, és a képződött kristályokat elkülönítjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy interleukin-4 30–50 mg/ml koncentrációjú oldatát inkubáljuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy interleukin-4 oldatát 40 mg/ml koncentrációjú oldatát inkubáljuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az interleukin-4 40 tömeg%-os vizes ammónium-szulfát-oldattal szemben inkubáljuk.

5. Eljárás hatóanyagként kristályos interleukin-4-et tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított hatóanyagot egy fém komplexképzővel és/vagy a gyógyszer technológiában általánosan használt segédanyagokkal keverjük, és a keveréket gyógyszerkészítménnyé feldolgozzuk.