

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: **C 07 K 14/61** **C 07 K 1/00**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 06390**

(22) Indleveringsdag: **1989-12-15**

(24) Løbedag: **1989-12-15**

(41) Alm. tilgængelig: **1990-06-17**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-08-18**

(30) Prioritet: **1988-12-16 US 285477**

(73) Patenthaver: **American Cyanamid Company, One Cyanamid Plaza, Wayne, New Jersey 07470, USA**

(72) Opfinder: **Kevin Michael McCoy, 921 Garden Street, Hoboken, New Jersey 07030, USA**
Robert A. Frost, 10 Bedford Place, Yonkers, New York 10710, USA

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til opløseliggørelse, naturering og nedsættelse af dimerisering af somatotropin**

(57) Sammendrag:

Ved en fremgangsmåde til opløseliggørelse og nature-
ring af somatotropin, der omfatter:

(a) dispergering af refraktile legemer af somatotropin
i vand i en passende koncentration,

(b) indstilling af pH-værdien til et område fra ca.
11,5 til ca. 12,5,

(c) bibeholdelse af pH-værdiområdet i tilstrækkelig
tid til opløseliggørelse af de refraktile legemer,

(d) genjustering af pH-værdien af opløsningen til et
område fra ca. 11 til 12, og

(e) bibeholdelse af opløsningen ved pH-værdien i det
genjusterede område i tilstrækkelig tid til,
fås korrekt natureret monomert somatotropin i godt udbytte.

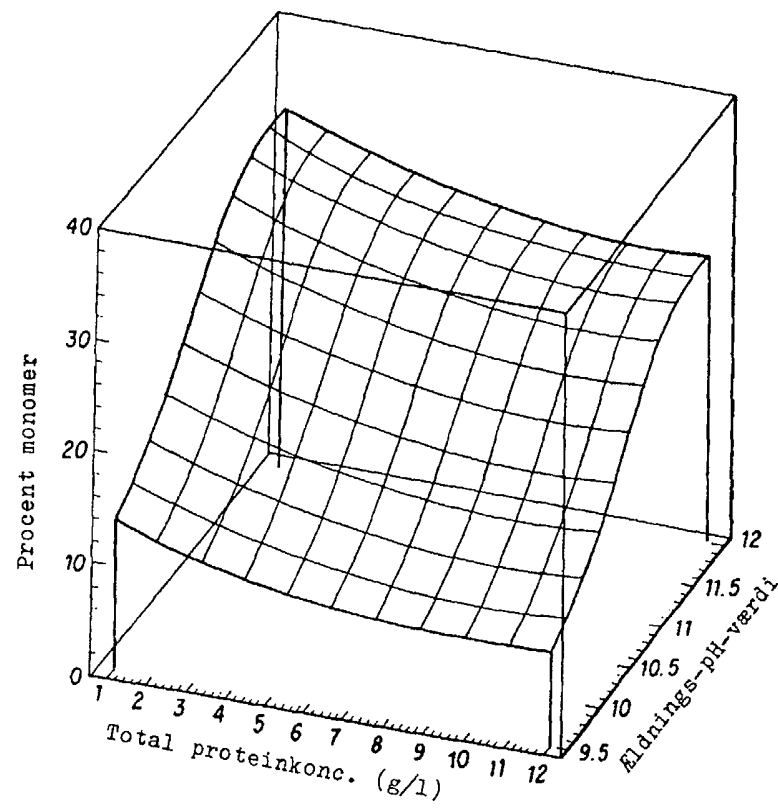


FIG. 1

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til opløseliggørelse, naturering og nedsættelse af dimerisering af somatotropin.

I de senere år har rekombinant DNA-teknologi gjort det muligt at fremstille proteiner i stor skala. Flere metoder til opløseliggørelse og naturering af somatotropin er omhandlet i US patentskrifter. F.eks. beskrives der i US patentskrift nr. 4.511.503 og EP 0 173 215 en typisk procedure til udvinding af proteiner fra refraktile legemer. Refraktile legemer er uopløselige korn af aggregeret denatureret somatotropin, der er lokaliseret i cytoplasmaet af *Escherichia coli* (*E. coli*), og som er synlige som lyse pletter under et fasekontrastmikroskop. De refraktile legemer forårsages af overproduktion af somatotropin som et resultat af genetisk manipulering af *E. coli*-plasmid-DNA. De refraktile legemer behandles ofte med et stærkt denatureringsmiddel eller chaotropisk middel, som bevirker, at de ukorrekt foldede molekyler udfolder sig og bliver opløselige. Proteinet skal derefter renatureres. Korrekt natureret monomert somatotropin er målet. De refraktile legemer kan ikke anvendes uden denne udfoldning og genfoldning, fordi de er biologisk inaktive i den refraktile tilstand. Det mest almindeligt anvendte stærke denatureringsmiddel ved procedurer af denne type har været guanidin-hydrochlorid.

Andre metoder har involveret andre chaotropiske midler, såsom natriumdodecylsulfat (SDS) (j.f. f.eks. US patentskrift nr. 4.677.196) eller svage denatureringsmidler, såsom urinstof (j.f. f.eks. US patentskrift nr. 4.731.440).

Alle metoderne til opløseliggørelse og naturering af somatotropin har haft problemer. Guanidin-hydrochlorid er meget kostbart og skal udskiftes for, at natureringsprocessen forløber. SDS er et særdeles effektivt denatureringsmiddel og meget mindre kostbart end guanidin-hydrochlorid, men SDS binder kraftigere til det denaturerede protein, hvilket gør fuldstændig fjernelse fra proteinet problematisk og samtidig forøger procesomkostningerne. Urinstof er almindeligt an-

vendt som et svagere denatureringsmiddel eller chaotropisk middel. Imidlertid har selv metoder, hvor der anvendes urin-stof, haft problemer, såsom forurening af slutproduktet og håndterings-, oplagrings- og spildbehandlingsproblemer.

5 Foruden de andre problemer ved konventionelle metoder er korrekt natureret monomer ikke det eneste produkt. Somatotropin-monomer er den mindste enhed af proteinet, der stadig bibeholder alle egenskaberne og den biologiske aktivitet af somatotropin. Typisk består somatotropin-monomer
10 af ca. 191 aminosyrerester og har en molekylvægt på rundt regnet 22.000. Det monomere molekyle er hverken covalent bundet eller ikke-covalent knyttet til andre lignende molekyler.

Somatotropin-dimer består af to monomer-molekyler, der
15 enten er covalent forbundet, f.eks. via intermolekylære disulfidbindinger, eller ikke-covalent knyttet til hinanden. Dimer-molekylet består af det dobbelte antal aminosyrerester og har den dobbelte molekylvægt af et monomert molekyle.

Ved anvendelse af konventionelle metoder dannes der
20 uheldigvis en vis mængde dimer samt proteinmolekyler med højere molekylvægt. Kun monomeren og ikke dimeren er biologisk anvendelig.

Der foreligger derfor et behov for en kommercielt gennemførlig metode til opløseliggørelse og naturering af
25 somatotropin, der giver et godt udbytte af monomer uden for meget dimer og uden anvendelse af chaotropiske midler.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til opløseliggørelse, naturering og nedsættelse af dimerisering af somatotropin uden anvendelse af chaotropiske mid-
30 ler. Fremgangsmåden omfatter

- (a) dispergering af refraktile legemer af somatotropin i vand i en koncentration på mindre end 5 g/liter,
- (b) indstilling af pH-værdien til et område fra 12,0 til 12,2,
- 35 (c) bibeholdelse af pH-værdiområdet i 2-20 minutter til opløseliggørelse af de refraktile legemer,

(d) genjustering af pH-værdien af opløsningen til et område fra 11,3 til 11,7, og

(e) bibeholdelse af opløsningen ved pH-værdien i det genjusterede område i 5-12 timer ved en temperatur på 20-
5 30°C, således at somatotropinindholdet i opløsning omfatter korrekt natureret monomert somatotropin i godt udbytte.

Overraskende medfører den foreliggende opfindelse lavere dimer-dannelse, og behovet for særskilte renature-ringstrin eller -midler undgås.

10 Fig. 1 på tegningen viser skematisk udbyttet af monomer i afhængighed af ældnings-pH-værdien og koncentrationen af protein.

Fig. 2 viser skematisk den dannede mængde dimer i afhængighed af ældnings-pH-værdien og koncentrationen af
15 protein.

Fig. 3-7 viser gelpermeationschromatografi-resultaterne af den omhandlede fremgangsmåde i afhængighed af tiden (henholdsvis 5 minutter, 1 time, 2 timer, 5 timer og 10 timer).

20 "Somatotropin" som anvendt i den foreliggende beskrivelse betegner (1) animalsk væksthormon, derivater, analoge og fragmenter deraf af en hvilken som helst art, f.eks. humant, bovint eller porcint, (2) forstadier for vækstinsulin, såsom reduceret (-SH) væksthormon og S-beskyttet væksthormon, f.eks. væksthormon-S-sulfonat, (3) varianter
25 af væksthormon eller dets forstadier, f.eks. strukturer, der er modificeret til forlængelse og/eller forkortelse af væksthormon-aminosyresekvensen, f.eks. 20 K-varianten af humant væksthormon, methionyl-humant væksthormon, Δ7- og
30 Δ9-porcint væksthormon og lignende, og (4) analoge af væksthormon eller dets forstadier, f.eks. strukturer, hvori væksthormon-aminosyresekvensen er modificeret ved erstatning af en eller flere aminosyrerester. Både rekombinant fremstillet som somatotropin og naturligt forekommende somatotropin
35 samt enhver anden type af somatotropin kan anvendes ved den foreliggende opfindelse.

Det første trin i den her omhandlede fremgangsmåde er dispergering af de refraktile legemer af somatotropin i vand (fortrinsvis deioniseret vand) i en koncentration på mindre end 5,0 g/liter og fortrinsvis i området fra 0,5
5 til 5,0 g/liter. Særlig foretrukket er en koncentration på ca. 2,5 g/liter. Hvis koncentrationen er over 5,0 g/liter, er processen tilbøjelig til at lide derunder. Selv om opløsninger ved koncentrationer under ca. 0,5 g/liter synes at give bedre resultater med hensyn til det procentiske udbytte
10 af monomer, er det ikke fordelagtigt at anvende en sådan fortyndet opløsning på grund af oplagringsomkostningerne, kapitalomkostningerne og størrelsen af udstyret samt de yderligere trin, der kræves i processen til fjernelse af den overskydende væske.

15 pH-værdien af det koncentrerede somatotropin indstilles til et område fra 12,0 til 12,2, til opløseliggørelse af somatotropinet i vandet. Enhver stærk base kan anvendes til indstilling af pH-værdien af opløsningen (f.eks. tilsætning af natriumhydroxid eller kaliumhydroxid). Denne opløseliggørelse gennemføres i løbet af 2 til 20 minutter. Ved en
20 pH-værdi i dette område opløses de refraktile legemer synligt, og opløsningen bliver klar.

Efter at de refraktile legemer af somatotropin er opløst, genjusteres pH-værdien til et område fra 11,3 til
25 11,7. Nedsættelsen af pH-værdien forøger hastigheden af natureringen. pH-Værdien kan nedsættes ved enhver metode, f.eks. ved tilsætning af phosphorsyre. Den genjusterede pH-værdi er fortrinsvis på 11,5. Det har overraskende vist sig, at når pH-værdien sænkes til det anførte interval, dannes der
30 mindre dimer og en større mængde monomer. Den mindre dannelse af dimer og den større dannelse af monomer ved genjustering af pH-værdien er overraskende, fordi procentdelen af dannet dimer eller monomer ville forventes at forblive den samme. Fig. 2 viser det uventede resultat, at dimerdannelsen for-
35 mindskes ved anvendelse af det anførte pH-værdiinterval ifølge den foreliggende opfindelse.

En pH-værdi lavere end ca. 11 kan anvendes, men udbyttet påvirkes generelt uheldigt, og der dannes en større mængde dimer. Hvis pH-værdien sænkes for meget, er der desuden risiko for, at somatotropinet vil udfælde fra opløsningen. Modsat, hvis pH-værdien ikke genjusteres, tager natureringsprocessen længere tid, og nedbrydningsreaktioner, såsom deamidering, er mulige. Imidlertid kan forskellige typer af somatotropin (f.eks. forskellige analoge, derivater, forstadier eller varianter af væksthormon) gøre det fordelagtigt at ændre pH-værdiintervallet.

Opløsningen holdes i det genjusterede pH-værdiinterval i 5 til 12 timer (fortrinsvis ca. 10 timer) ved 20-30°C, indtil mængden af monomer har nået sit maksimum. Dette bestemmes ved gelpermeationschromatografi. Fig. 3-7 viser det tidsmæssige forløb for proteinet ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Det skal bemærkes, at fig. 3-7 viser, at vejen er fra proteinaggregater med højere molekylvægt mod monomer, hvilket står i modsætning til den konventionelt foreslåede model, hvorved der anvendes denatureringsmidler, og som vil vise umiddelbart dannet monomer og ingen ændring (eller forøgelse) af molekylvægt, når monomeren foldes korrekt eller forener sig med andre proteinmolekyler.

Fig. 3 viser resultaterne af gelpermeationschromatografi (gpc) efter 5 minutter. Der kan identificeres tre toppe. "A"-toppen ved ca. 0,45 volumenenheder på abscissen, "B1"-toppen ved ca. 0,65 enheder og "B2"-toppen ved ca. 0,77 enheder. "A"-toppen udgøres af protein-urenheder med molekylvægte på over 1.000.000. "B1"-toppen er aggregeret somatotropin sammen med nogle proteinurenheder, f.eks. urenheder fra E. coli-værtsorganismen. "B2"-toppen er det monomere somatotropin ("B2"-toppen kan også omfatte nogle tilbageværende urenheder ud over monomer).

Fig. 4 viser resultaterne af gpc efter 1 time. Både "A"-toppen og "B1"-toppen er formindsket i størrelse, og "B2"-toppen er tydeligt mere udtalt.

Fig. 5 viser resultaterne af gpc efter 2 timer. "A"-toppen og "B1"-toppen er yderligere formindsket i størrelse, og "B2"-toppen er yderligere forøget.

Fig. 6 viser resultaterne af gpc efter 5 timer. Det skal bemærkes, at der har vist sig en lille fjerde top eller skulder ved ca. 0,7 volumenenheder. Denne skulder repræsenterer dannet dimer. Skulderen i fig. 6 viser den lave dimerdannelse ved den her omhandlede fremgangsmåde. Ved fremgangsmåder, hvor der dannes høje mængder af dimer, er en særskilt top ganske tydelig.

Fig. 7 viser resultaterne af gpc efter 10 timer. Der er ringe ændring i forhold til fig. 6, men "B2"-toppen, som repræsenterer monomer, er vokset lidt.

Fig. 3-7 viser, at der ved den foreliggende opfindelse tilvejebringes naturerende omgivelser. Proteinmolekylerne i de refraktile legemer adskilles og får lov at folde sig korrekt til dannelse af det biologisk aktive monomere somatotropin uden anvendelse af nogen denatureringsmidler og uden nogen særskilte renatureringstrin eller -midler.

Den resulterende opløsning indeholder korrekt naturet monomert somatotropin i et godt udbytte. Et godt udbytte er ca. 30 til ca. 45% eller højere af det totale opløste protein. Det totale protein omfatter alle former af somatotropin samt alle andre ikke-somatotropin-proteinurenheder, såsom urenheder fra E. coli-værtsorganismen. Udbytterne beregnet på somatotropin alene vil være meget højere. Udbytterne ved metoder, hvor der anvendes chaotropiske midler, er ca. de samme. Da der ved den foreliggende opfindelse ikke anvendes chaotropiske midler, har det resulterende monomere somatotropin imidlertid ingen spor af uønskelige urenheder, såsom SDS, guanidin-hydrochlorid eller urinstof.

Opfindelsen illustreres i de følgende eksempler.

Eksempel 1Bovint somatotropin

5 Fermenteringsmedium indeholdende E. coli-celler, som er modificeret genetisk til fremstilling af inklusionslegemer af bovint somatotropin, centrifugeres for at skille cellerne fra væsken. Cellerne genopslættes og brydes ved anvendelse af to passager ved et overtryk på 562 kg/cm² gennem en Gaulin-homogenisator. Suspensionen centrifugeres, og den fremkomne pellet genopslættes og behandles med lysozym og "Triton X-100"-detergent ved 37°C. Suspensionen centrifugeres, og den fremkomne pellet vaskes to gange med vand og centrifugeres efter hver vaskning. Den fremkomne pellet, der indeholder det uopløselige denaturerede bovine somatotropin, sættes til vand, og der indstilles en pH-værdi på 12,15 med natriumhydroxid, således at den totale proteinkoncentration er ca. 2,5 g/liter. Efter 20 minutter ved en pH-værdi på 12,15 og 25°C indstilles den klare opløsning til en pH-værdi på 11,5 og holdes i 8 timer. Opløsningen ultrafiltreres på en "Amicon H1P100-43"-hulfiberpatron med en afskæring ved en molekylvægt på 100.000. Permeatet opsamles og koncentrerer ved anvendelse af en "Amicon H1P10-43"-hulfiberpatron med en molekylvægtsafskæring på 10.000 til en koncentration på ca. 5 g/liter. Den koncentrerede opløsning indstilles til en pH-værdi på 9 ved anvendelse af et 1 N saltsyre og påføres i en mængde på 20 g bST pr. liter harpiks på en "DEAE-Sepharose Fast Flow"-anionbytter, som er ækvilibreret med 10 mM borat, pH-værdi 9. Efter vaskning med ækvilibreringspufferen elueres bST ved anvendelse af en 100 mM NaCl, 10 mM boratopløsning, pH-værdi 9. bST-Toppen koncentrerer og afsaltes med en fortyndet ammoniakopløsning under anvendelse af en "Amicon H1P10-43"-hulfiberpatron, indtil ledningsevnen af permeatet er 100 microsiemens/cm. Den afsaltede opløsning med en koncentration på ca. 2 g/liter frysetørres, hvorved der fås bovint somatotropin, som består veletablerede biolo-

giske og kemiske prøver.

Eksempel 2

5 Porcint somatotropin

Fermenteringsmedium indeholdende E. coli-celler, som er blevet modificeret genetisk til fremstilling af inklusionslegemer af porcint somatotropin, centrifugeres til
10 fraskillelse af cellerne fra væsken. Cellerne genopslættes og brydes ved anvendelse af to passager ved et overtryk på 562 kg/cm² gennem en Gaulin-homogenisator. Suspensionen centrifugeres, og den fremkomne pellet genopslættes og behandles med lysozym og "Triton X-100"-detergent ved 37°C.
15 Suspensionen centrifugeres, og den fremkomne pellet vaskes to gange med vand og centrifugeres efter hver vaskning. Den fremkomne pellet, der indeholder det uopløselige porcine somatotropin, sættes til deioniseret vand, således at den totale proteinkoncentration er ca. 2,5 g/liter. Den fremkomne
20 opslæmning blandes godt, medens der tilsættes 5 N natriumhydroxid til forøgelse af pH-værdien til 12,2. Opløsningen bliver langsomt klar i løbet af 5 minutter. Opløsningen ældes i 20 minutter ved 20°C. pH-Værdien sænkes derefter til 11,5 ved anvendelse af 1 M phosphorsyre og ældes i 10
25 timer. Monomerkoncentrationen som målt ved gelpermeationschromatografi er 1,05 g/liter ved slutningen af ældningsperioden.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til opløseliggørelse, naturering og nedsættelse af dimerisering af somatotropin, omfattende:

(a) dispergering af refraktile legemer af somatotropin
5 i vand i en koncentration på mindre end 5 g/liter,

(b) indstilling af pH-værdien til et område fra 12,0 til 12,2,

(c) bibeholdelse af pH-værdiområdet i 2-20 minutter til opløseliggørelse af de refraktile legemer,

10 (d) genjustering af pH-værdien af opløsningen til et område fra 11,3 til 11,7, og

(e) bibeholdelse af opløsningen ved pH-værdien i det genjusterede område i 5-12 timer ved en temperatur på 20-30°C, således at somatotropinindholdet i opløsning omfatter
15 korrekt natureret monomert somatotropin i godt udbytte.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved somatotropinet er bovint eller porcint somatotropin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, hvorved somatotropinet er rekombinant afledt somatotropin.

20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, hvorved somatotropinet er bovint eller porcint somatotropin.

5. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1-4, hvorved koncentrationen i trin (a) er ca. 0,5-5 g/liter.

25 6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, hvorved koncentrationen i trin (a) er ca. 2,5 g/liter, pH-værdien genjusteres til pH 11,5 i trin (d), og tidsrummet i trin (e) er ca. 10 timer.

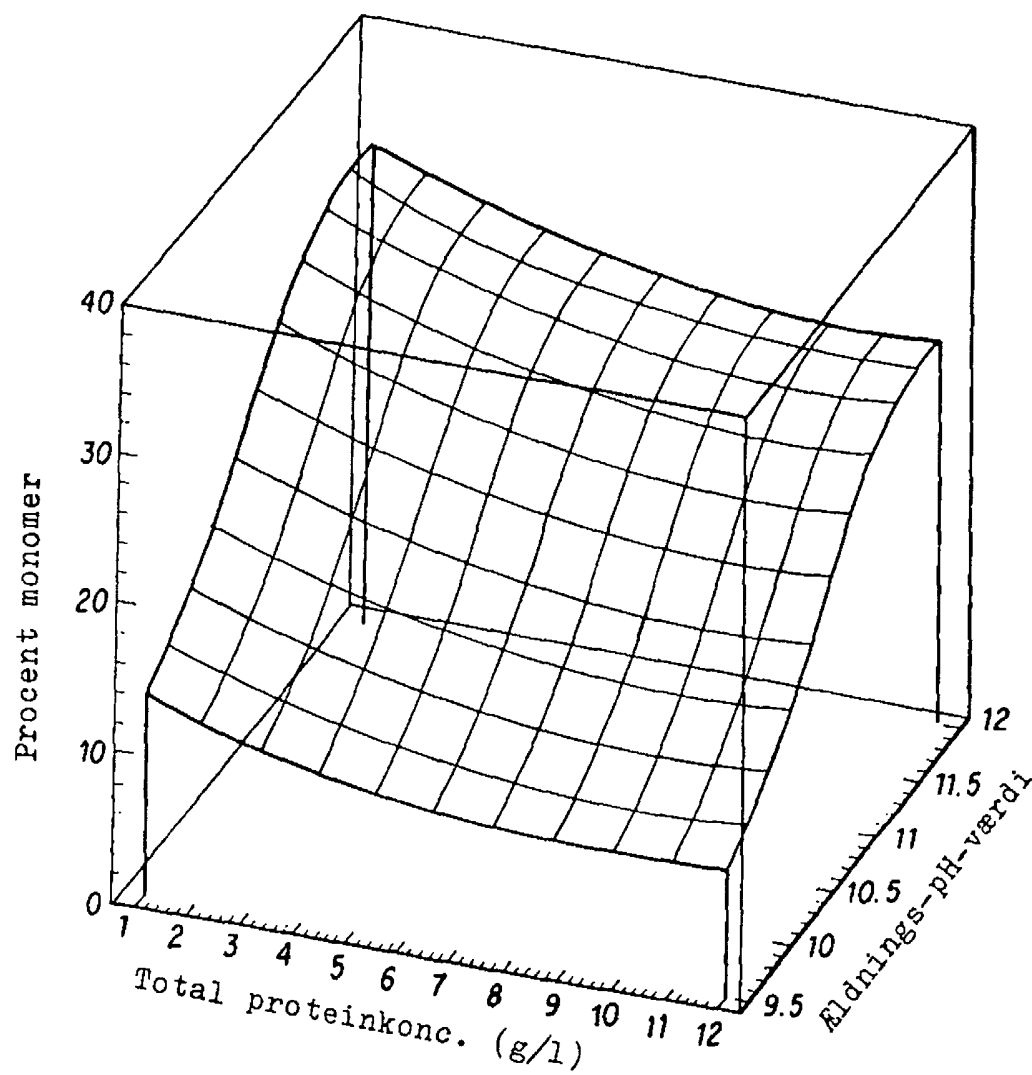


FIG. 1

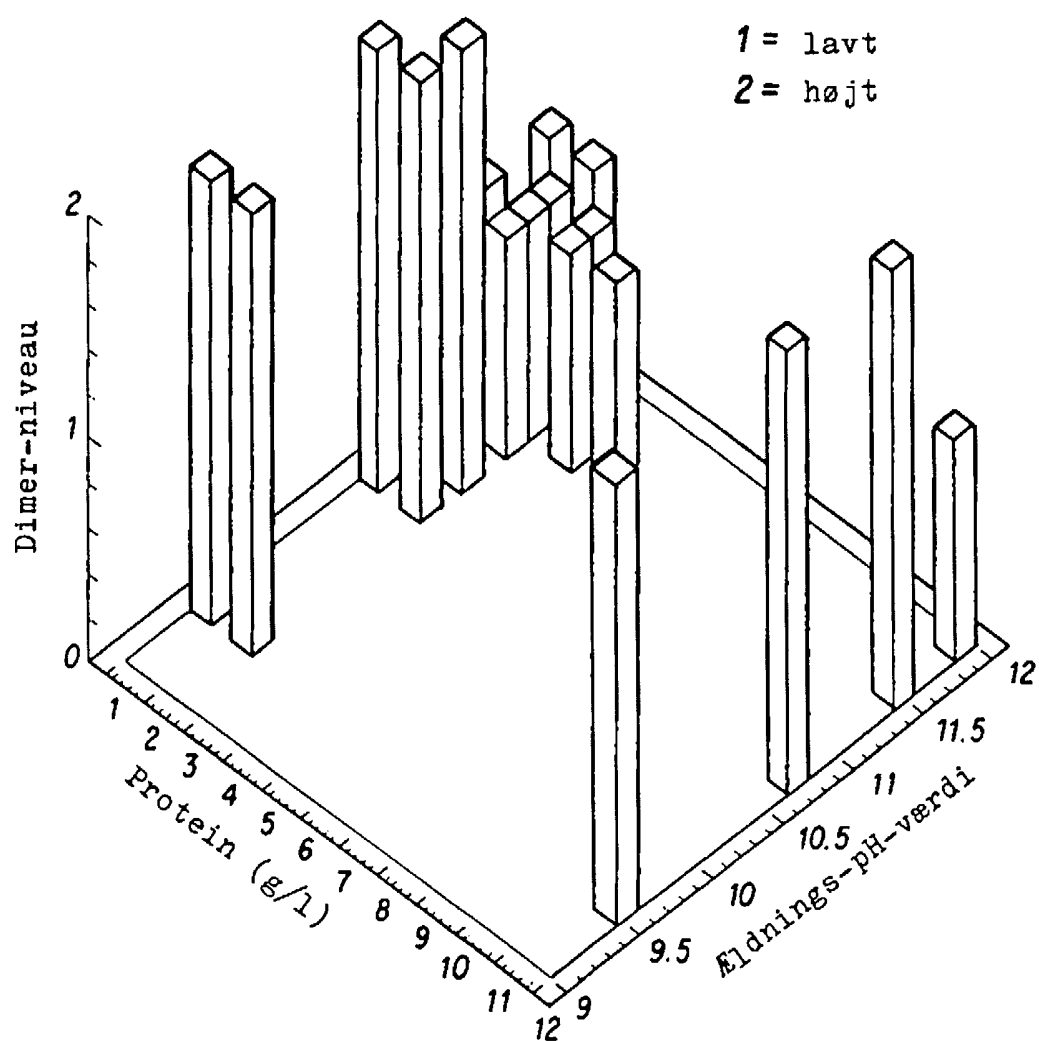


FIG. 2

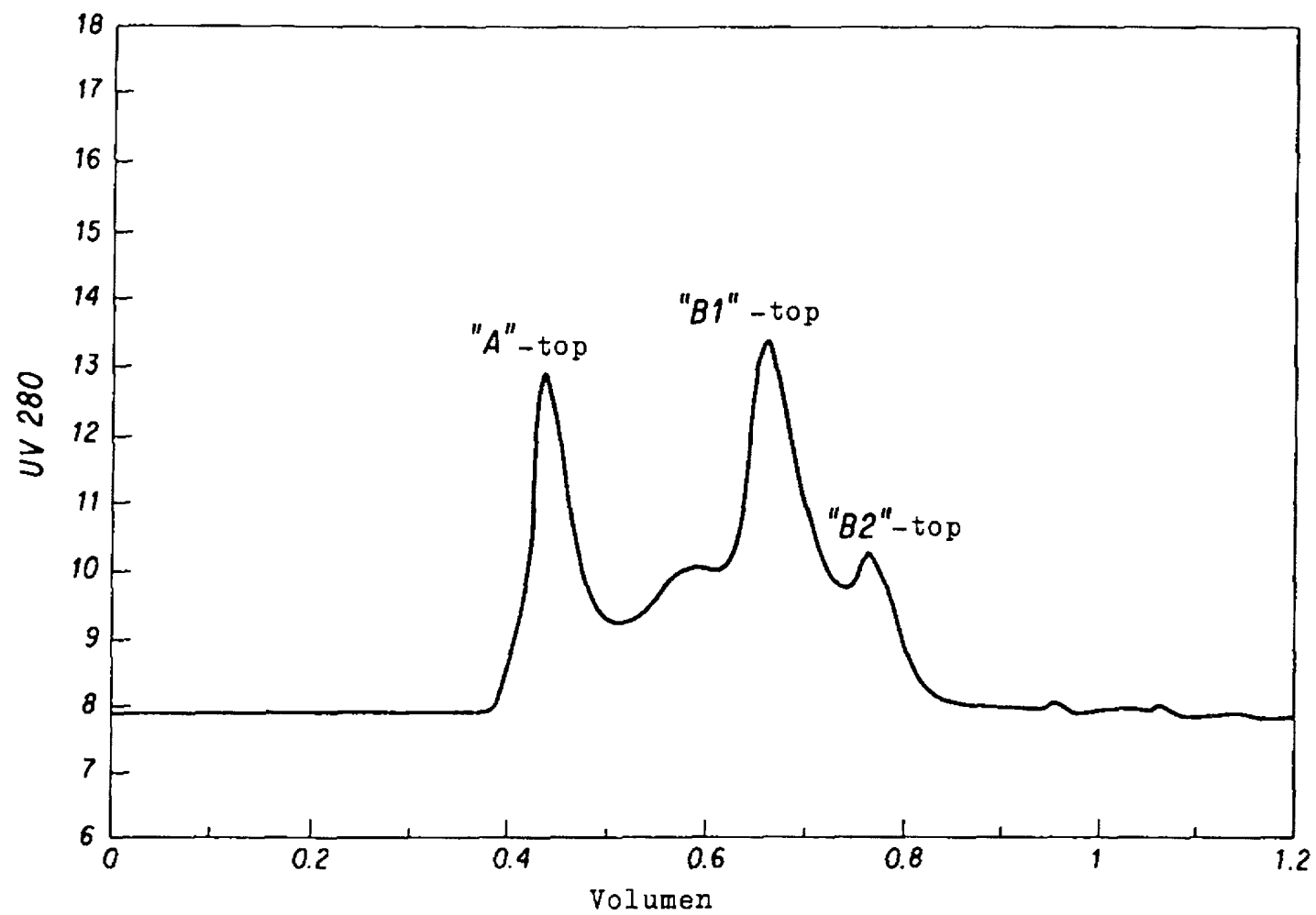


FIG. 3

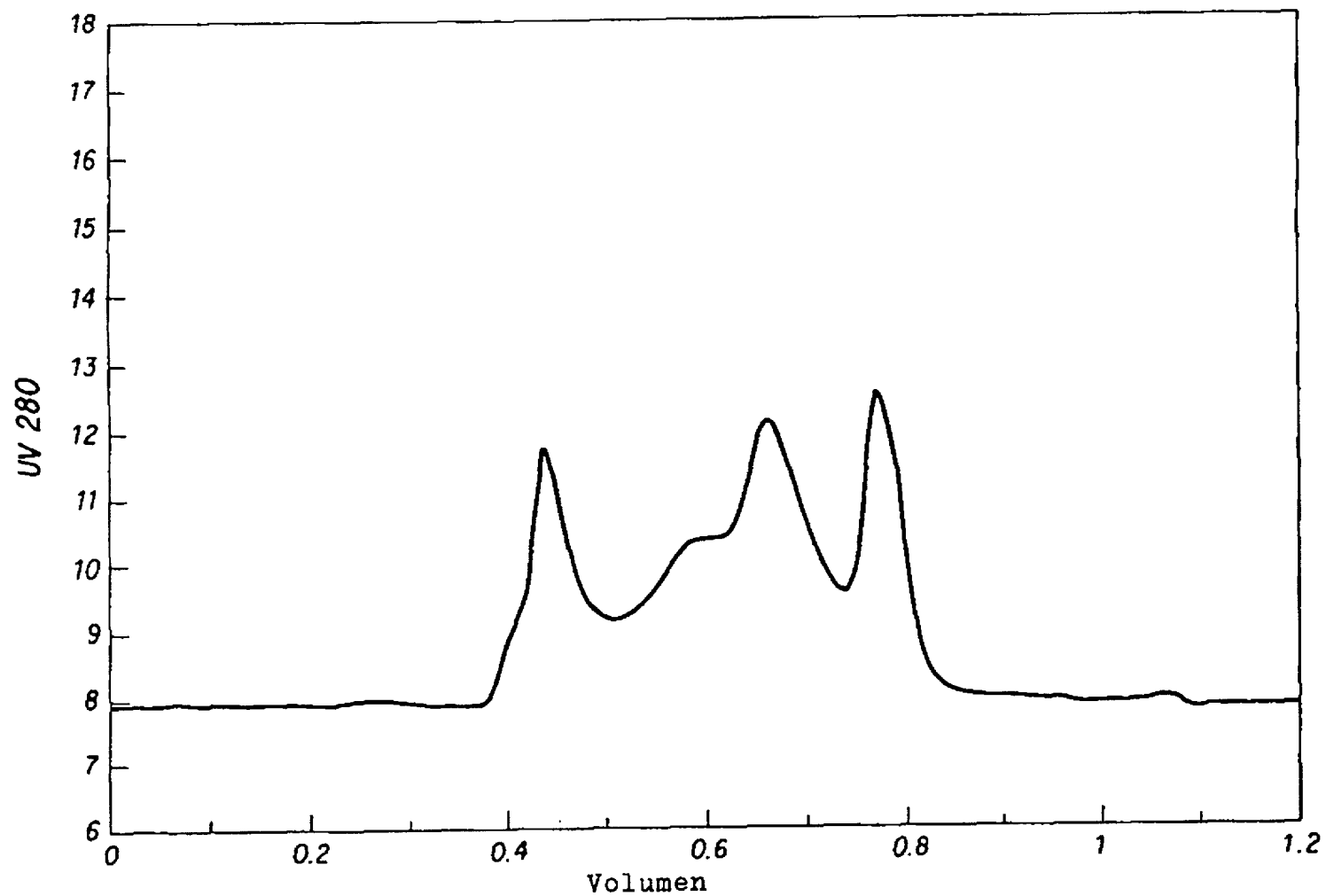


FIG. 4

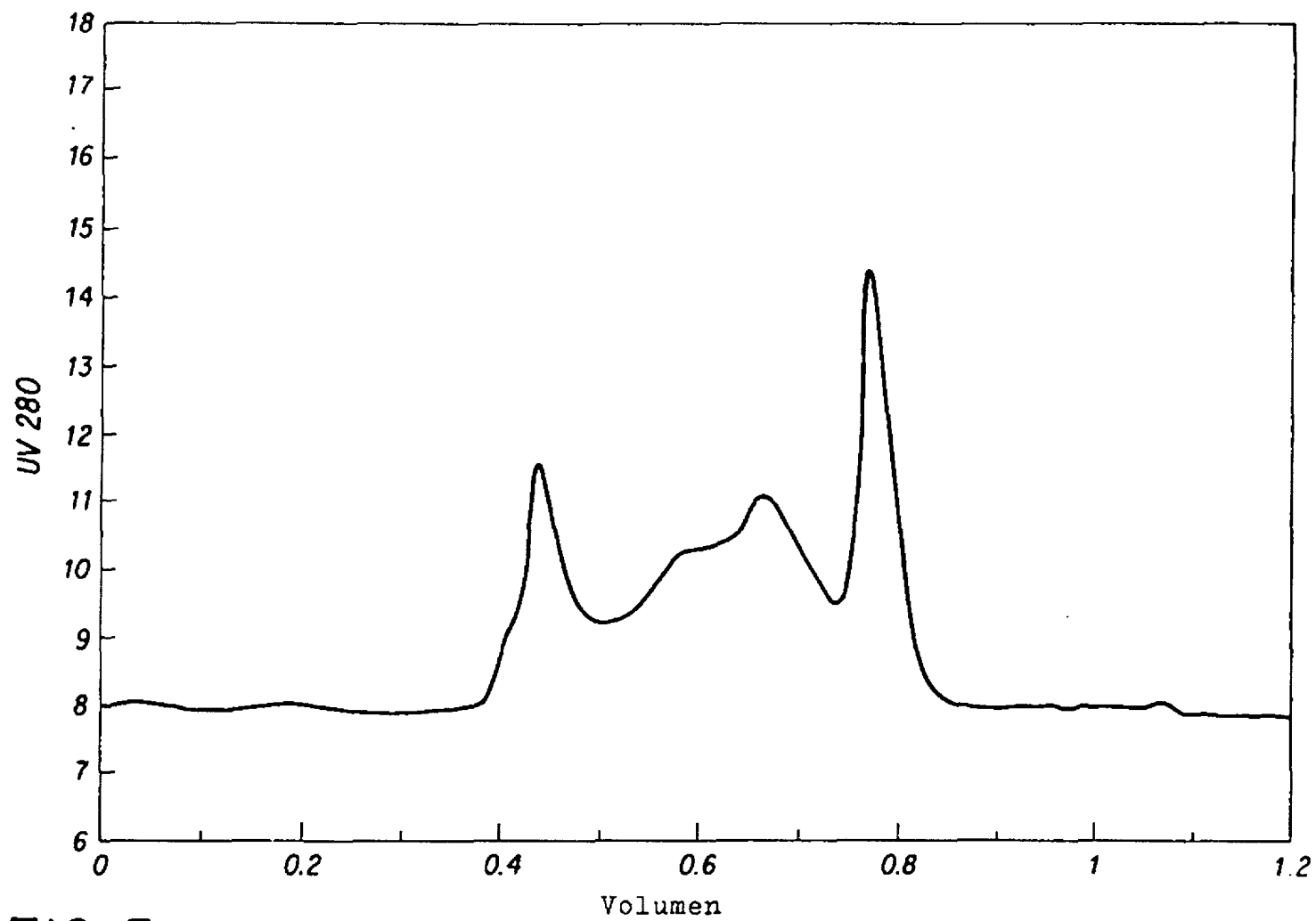


FIG. 5

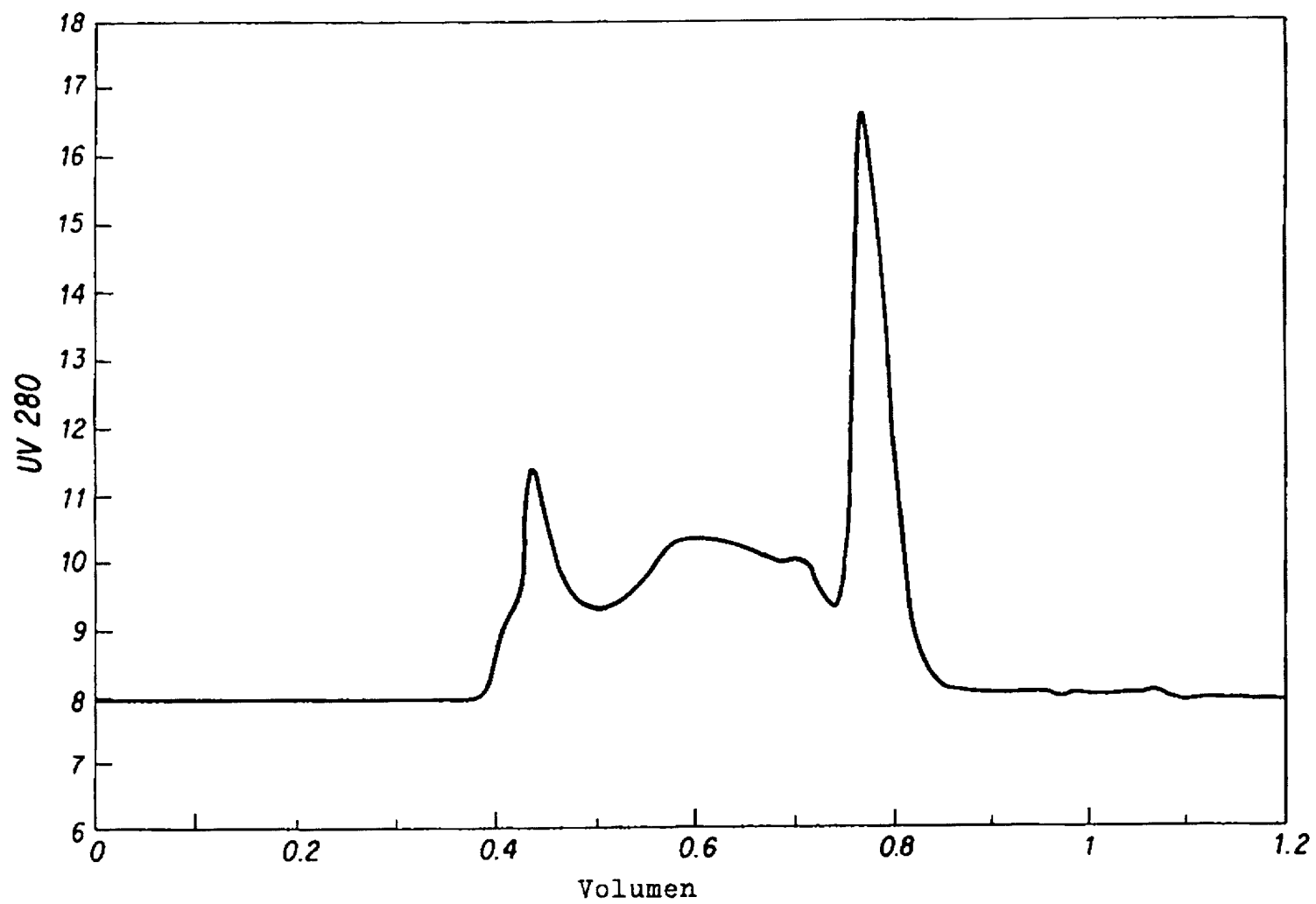


FIG. 6

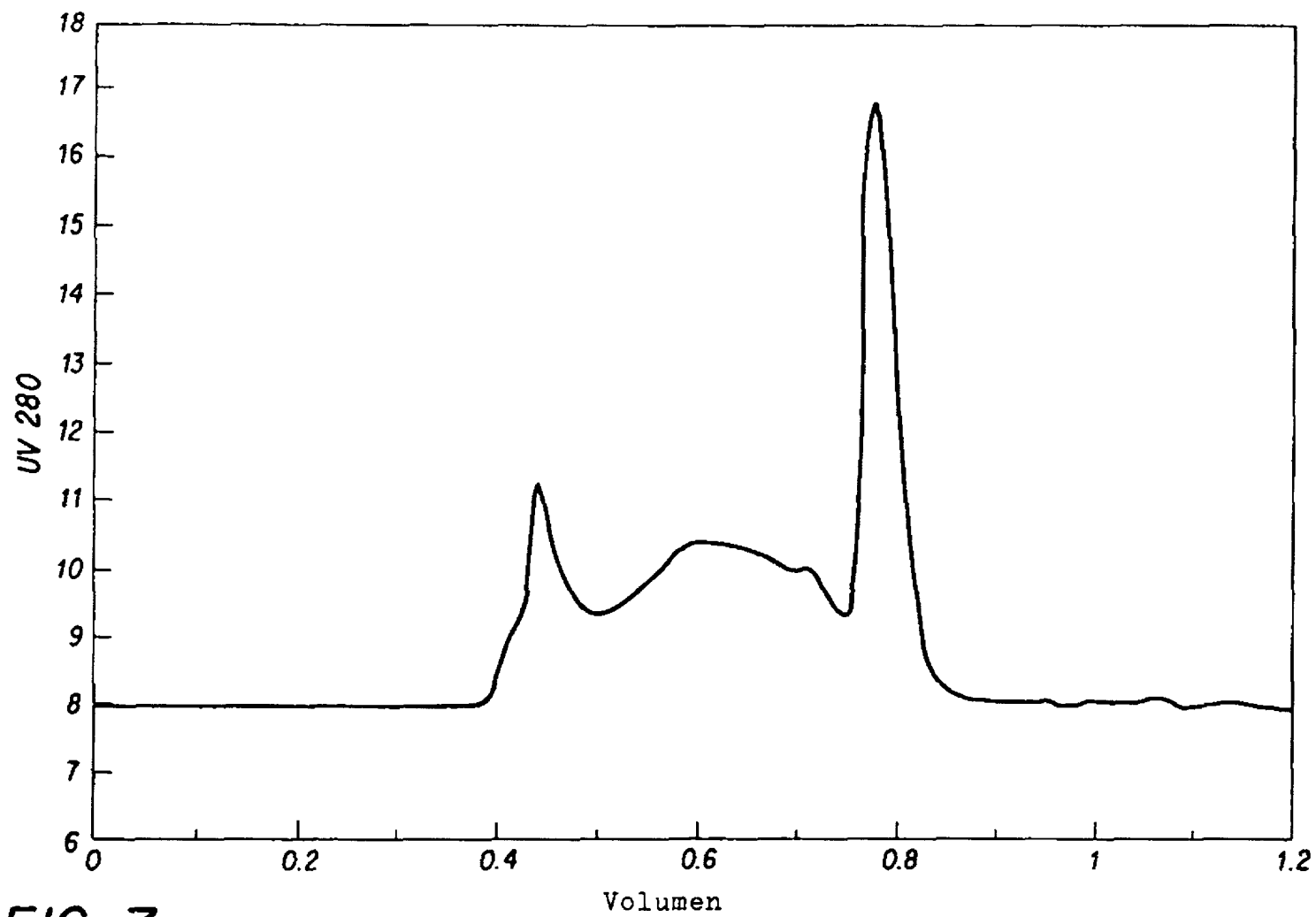


FIG. 7