



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 91103942.2

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/54

[45]授权公告日 1996年10月16日

[24]颁证日 96.7.19

[21]申请号 91103942.2

[22]申请日 91.6.13

[30]优先权

[32]90.6.15 [33]US[31]538,636

[73]专利权人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 杰拉尔德·S·哈蒙德 洪·V·李
T·L·纳加布胡山 保罗·赖歇特
保罗·P·特罗塔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成 曹恒兴

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 生产结晶白细胞介素-4的方法

[57]摘要

叙述了一种从含有硫酸盐或柠檬酸盐的溶液中结晶重组人白细胞介素-4 (rhuIL-4) 的方法。该结晶形式适于进行 X 射线衍射, 并在包括纯化、配制和制造在内的许多药学方法中具有广泛的应用。

权 利 要 求 书

1.一种产生由细菌产生的白细胞介素-4晶体的方法,该方法包括,在12℃或22℃的温度下,使含有20mg/ml由细菌产生的人白细胞介素-4、15% - 20%饱和的硫酸铵、40mM磷酸钠, pH为6.0的水溶液,与含有30 - 40%饱和的硫酸铵、40mM磷酸钠, pH为6.0的水溶液平衡。

说 明 书

产生结晶白细胞介素-4的方法

由T细胞产生的白细胞介素-4 (IL-4) 最初被描述为一种能辅助刺激活化B细胞增殖的鼠型因子 (Howard等, J. Exp. Med. 155 : 914, 1982)。随后证实, 鼠型IL-4能够对B细胞 (Paul等, Ann. Rev. Immunol. 5 : 429, 1987; Noelle等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6149, 1984; Roehm等, J. Exp. Med. 160 : 679, 1984; Vitetta等, J. Exp. Med. 162 : 1726, 1985; Coffman等, J. Immunol. 136 : 4538, 1986; Coffman等, J. Immunol. 136 : 949, 1986) 及包括T细胞 (Mosmann等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 5654, 1986; Fernandez — Botran等, J. Exp. Med. 164 : 580, 1986; Hu — Li等, J. Exp. Med. 165 : 157, 1987; Grabstein等, J. Immunol. 139 : 1148, 1987; Zlotnick等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 8856, 1987)、造血母细胞 (Rennick等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 6889, 1987; Peschel等, Blood 70 : 254, 1987) 和肥大细胞 (Mosmann, 同上) 在内的其它细胞类型产生多种生物学效应。

根据鼠型IL-4的同源性, 已克隆出了编码人白细胞介素-4 (huIL-4) 的cDNA (Yokota等, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 83 : 5894, 1986), 并在哺乳动物宿主 (Le 等, J. Biol. Chem. 263 : 10817, 1988; Sonoda 等, J. Biotechnology 9 : 61, 1988; Takebe 等, Mol. Cell Biol. 8 : 466, 1988) 和细菌宿主 (Van Kimmenade 等, Eur. J. Biochem. 173 : 109, 1988) 中进行了表达。和鼠型 IL-4 一样, 重组 huIL-4 (rhIL-4) 也是一种对多种细胞类型有作用的多效性淋巴细胞活素。例如, rhIL-4 能够诱导活化 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖 (Spits 等, J. Immunol. 139 : 1142, 1987; DeFrance 等, J. Immunol. 139 : 1185, 1987), 增强 II 类主要组织相容性抗原和 B 细胞上 IgE 的低亲和性受体的表达 (Rousset 等, J. Immunol. 140 : 2625, 1988; DeFrance 等, J. Exp. Med. 165: 1459, 1987), 诱导 IgE 和其它免疫球蛋白的产生 (Pene 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85 : 6880, 1988)。rhIL-4 能够抑制 B 细胞来源的慢性淋巴细胞性白血病细胞的 IL-2 依赖性增殖, 这提示它可临床应用于 B 细胞肿瘤 (Karray 等, J. Exp. Med. 168 : 85, 1988)。

毫克量纯化 rhIL-4 的可得性促进了有关该蛋白质的结构和结构-功能关系研究的开展。本发明涉及结晶 rhIL-4 产生条件的发现。本发明进一步涉及结晶 rhIL-4 本身。该晶体适于进行 X 射线衍射研究, 并可应用于 rhIL-4 的纯化和配制。

本发明就其最宽的方面而言, 涉及结晶形式的白细胞介素-4。

本发明进一步涉及结晶形式的人白细胞介素-4。

本发明进一步涉及结晶形式的、用重组 DNA 技术产生的人白细胞

介素-4。

本发明进一步涉及可能是糖基化的或非糖基化的、结晶形式的白细胞介素-4。

本发明进一步涉及一种产生白细胞介素-4晶体的方法，该方法包括，从含有硫酸盐或柠檬酸盐的pH 5-7缓冲水溶液中结晶出白细胞介素-4。

本发明的结晶白细胞介素-4可用于X射线晶体学分析，还可用于制备用于治疗对白细胞介素-4治疗敏感的任何医学症状的药物组合物。

为说明本发明的实施，在大肠杆菌中表达了成熟形式的huIL-4。同样可以采用其它IL-4及其它形式的rhuIL-4。用常规色谱法(Le等，同上)从细胞上清液中纯化出rhuIL-4。在24孔组织培养皿(Multiwell, Becton Dickenson & Co, Lincoln Park, NJ)中进行悬滴蒸气扩散实验。使含有20毫克/毫升huIL-4、15-20%饱和的硫酸铵、40mM磷酸钠(pH 6.0-7.0)的液滴(6 μ l)，从扣在24孔组织培养皿上的硅化盖玻片上悬下。使这些液滴在12或22 $^{\circ}$ C下与1毫升30-40%饱和的硫酸铵、40mM磷酸钠(pH 6.0-7.0)平衡。在预先设定在12 $^{\circ}$ 或22 $^{\circ}$ C的REVCO环境实验室中进行控温保温。

用分光光度法在278nm测定rhuIL-4在各种缓冲液中的浓度，所采用的消光系数为0.57/cm/mg/ml。按Laemmli的方法(Nature 227:680,1970)进行十二烷基硫酸钠聚丙

烯酰胺凝胶电泳 (SDS — PAGE)。在 Rainin C4 柱 (4.6 × 250 nm; Dynamax, 300 埃) 上进行反相 HPLC, 用乙腈在 0.1% 三氟乙酸中的线性梯度展开。如前人所述用人外周血淋巴细胞进行 T 细胞增殖活性的测定 (Yokota 等, 同上)。为进行 X 射线研究, 将大四方晶体装在玻璃毛细管中, 利用从 Rigaku RU — 300 旋转阳极发出的 CuK α 辐射, 在 22 °C 下用回摆相机拍照。在 Nicolet X — 100A 特定范围放射线检测器上利用相同的辐射源取得一套完整的原始数据。

如前面所指出的, 为了举例说明, 本发明所述的结晶人白细胞介素 — 4 为得自大肠杆菌的重组人白细胞介素 — 4。该蛋白质的一级结构为:

	5	10	15	20	25	30
1	HKCDITLQE	I	IKTLNSL	TE	QKTLCTEL	TV T
31	DI FAASKNT	TE	KETFCRA	ATVLRQ	FYSHHE	
61	KDTRCLG	ATAQQ	HRHKQL	IRFLK	RDRNL	
91	WGLAGLNS	CPVKEAN	QSTLEN	FLERL	KTI M	
121	REKYSK	CSS				

用硫酸铵作沉淀剂已使 rhuIL — 4 结晶出针状和大四方状晶体。在含有 3.4% 硫酸铵的 40 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 于 12 °C 下保温 21 天后, 可达到最佳的结晶效果。在 pH 值在 5.0 — 7.0 范围, 硫酸铵浓度在 30 — 40% 饱和范围时, 在磷酸钠中也观察到四方晶体。

进行结晶时的 pH 范围为 5 — 7, 优选 5.5 — 6.5, 最优选

的是约 pH 6.0。温度可在约 5—25 °C 的范围，优选 12—22 °C，最优选的是约 12 °C。平衡态时蛋白质的浓度应为约 5—60 mg / ml，优选 30—50 mg / ml，最优选的是约 40 mg / ml。

在 12 °C—22 °C 下保温的时间可在 2—20 天之间变化。预计这里所述的结晶方法也可用于结晶得自其它宿主细胞（如培养的哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞和其它细胞）的 rhuIL-4 或得自天然来源（如人外周血淋巴细胞或者构成性地产生 huIL-4 的人细胞系）的 huIL-4。预计该方法还将适用于得自其它物种的同源白细胞介素-4 蛋白。

已在室温下（22—25 °C）从悬滴中分离出了结晶 rhuIL-4，并在 55% 硫酸铵、40 mM 磷酸钠缓冲液（pH 6.6）中进行了彻底洗涤。重新溶解于含 0.15 M 氯化钠的 20 mM 磷酸钠缓冲液（pH 7.4）中后，晶体呈现出与未结晶过的对照 rhuIL-4 样品相同的 T 细胞增殖活性（ 2.0×10^7 单位 / 毫克）。进行 SDS — PAGE 时，重新溶解的 rhuIL-4 晶体的电泳迁移率与对照样品相同。同样，重新溶解后晶体的反相 HPLC 洗脱图形与对照样品的洗脱图形很难区分。没有由于在 22 °C 下长时间保温而造成蛋白质的明显降解。更为重要的是，经过结晶过程后再重新溶解于生理缓冲液中，并未使 rhuIL-4 的 T 细胞增殖活性失活。

首先用特定范围放射线检测器以 2.7 Å 的分辨率取得 X — 射线衍射数据。回摆框覆盖 0.25，测量 10 分钟。用 XENGEN 处理程序进行强度数据的指标化和积分（Howard 等，J. Appl. Crystal-

logr. 20 : 383, 1987)。数据在四方晶系中指标化，其中 $a = 92.1(2)$ ， $b = 92.1(7)$ ， $c = 46.5(1)\text{Å}$ 。空间群为 $P4_2 2_1 2$ 或 $P4_2 2_1 2$ 。

对白细胞介素-4进行后续的X射线回摆照相证实了该空间群和晶胞参数。这些四方晶对X射线稳定，在室温下至少衍射5天，衍射分辨率至少为 2.7Å 。

大规模的结晶可以用相当于蒸气扩散的方法，即透析法和超滤法来进行。一旦建立了最佳实验条件，便可以用由悬滴实验得到的晶种来加速大规模结晶。虽然优选使用硫酸铵作沉淀剂，但也可用其它常用的硫酸盐和柠檬酸盐来代替，如硫酸钠、硫酸钾、硫酸钙或硫酸镁；柠檬酸钠，以及其它柠檬酸盐 (McPherson, 《蛋白质晶体的制备和分析》，1982, John Wiley & Sons, New York, New York)。可以在临床制备过程中引入大规模结晶 rhuIL-4 的操作作为最终的纯化步骤和/或浓缩步骤。由于这些晶体与在含防腐剂溶液中贮存的 rhuIL-4 相比具有固有的稳定性，以结晶形式长期贮存大批的 rhuIL-4 药物也是很理想的。

由上述方法制备的晶体对药物剂型的制备也构成一种特别有利的形式。例如，这些晶体可用作 rhuIL-4 体内缓释制剂的基础。据认为，可以先形成金属（例如锌或铁）与 huIL-4 的配合物，然后再结晶。这些配合物的晶体也可用于含有适当药用添加剂的缓释蛋白制剂中。类似的缓释蛋白制剂的例子有锌-胰岛素结晶配合物

(《Remington 药理学》，1985, Gennaro, A. R. 编, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania,

974 - 976页)和锌-胰岛素-鱼精蛋白结晶配合物(《制药大全》, 1989, Sittig, M. 编, 820 - 821页)。

含有本发明结晶白细胞介素-4的缓释药物组合物可如下制备:
将这种白细胞介素-4与如上所述的金属和/或蛋白配位剂混合。