

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 97.985

**REQUERENTE:** SCHERING CORPORATION. norte-americana. industrial. 2000 Galloping Hill Road; Kenilworth. New Jersey 07033. Estados Unidos da América do Norte

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE INTERLEUCINA-4 CRISTALINA"

**INVENTORES:** Gerald Hammond. Hung V. Le. T. L. Nagabhusan Paul Reichert e Paul P. Trotta

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América do Norte. 15 de Junho 1990  
No.538636

77.985

SCHERING CORPORATION  
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE INTERLEUCINA-4 CRISTALINA"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a cristalização de interleucina-4 humana recombinante (rhIL-4) a partir de uma solução que contém um sal sulfato ou citrato. A forma cristalina é adequada para difracção de raio-X e tem uma larga gama de aplicações em vários processos farmacêuticos que incluem purificação, formulação e manufactura.

ANTECEDENTES DO INVENTO

A interleucina-4 derivada da célula T (IL-4) foi originalmente descrita como um factor de murino que pode co-estimular a proliferação das células B activadas [Howerd et al., J. Exp. Med. 155:914 (1982)]. Subsequentemente, foi demonstrado que a IL-4 de murino exerce uma série de efeitos biológicos nas células B [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. 136:4538 (1986); Coffman et al., J. Immunol. 136:949 (1986)] e noutros tipos de células que incluem as células T (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)], as células progenitoras hematopoiéticas [Rennick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6839 (1987); Peschel et al., Blood 70:254 (1987)] e as células de glândulas (Mosmann, acima).

Basiado na homologia com a IL-4 de murino, um cDNA de código humano da interleucina-4 (huIL-4) foi clonado [Yokota et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5894 (1986)] e colocado em ambos mamíferos [Le et al., J. Biol. Chem. 263:10817 (1988); Sonoda et al., J. Biotechnology 9:61 (1988); Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8:466 (1988)] e hospedeiros bacterianos [van Kimmenade et al., Eur. J. Biochem. 173:109 (1988)]. Igualmente a IL-4 de murine, a huIL-4 recombinante (rhIL-4) é um linfócito pleiotrópico que actua numa série de tipos de células. Assim, por exemplo, o rhIL-4 pode induzir a proliferação de ambos linfócitos T e B activados [Spits et al., J. Immunol. 139:1142 (1987); DeFrance et al., J. Immunol. 139:1135 (1987)], aumenta a expressão de

histocompatibilidade dos antígenos principal da classe II e baixa a afinidade do receptor para o IgE nas células B [Rousset et al., J. Immunol. 140:2625 (1988); DeFrance et al., J. Exp. Med. 165:1459 (1987)] e induz a produção de IgE e de outras imunoglobulinas [Pene et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6880 (1988)]. A capacidade de rhuIL-4 para a inibição de IL-4 que depende da proliferação de células leucêmicas linfocíticas de origem da célula B, sugeriu uma aplicação clínica em neoplasmas das células B [Karray et al., J. Exp. Med. 168:85 (1988)].

A disponibilidade de quantidades de miligrama de rhuIL-4 purificada facilita a iniciação de estudos da estrutura e as relações função - estrutura da proteína. O presente invento relaciona-se com a descoberta de condições para a produção de rhuIL-4 cristalina. O invento ainda se relaciona com a própria rhuIL-4 cristalina. Os cristais são adequados para estudos de difração de raio X e têm aplicações na purificação e na formulação de rhuIL-4.

#### SUMÁRIO DO INVENTO

No seu aspecto mais amplo o invento relaciona-se com a Interleucina-4 na forma cristalina.

O invento ainda se relaciona com a interleucina-4 humana na forma cristalina.

O invento ainda se relaciona com a interleucina-4 humana que foi produzida por técnicas de DNA recombinante na forma cristalina.

O invento ainda se relaciona com a interleucina-4 na forma cristalina que pode estar glicosilada ou não-glicosilada.

O invento ainda se relaciona com um método para a produção de cristais de interleucina-4, cujo método compreende a cristalização da interleucina-4 a partir de uma solução aquosa de pH 5 - 7 tamponizada, que compreende um sal de citrato ou de sulfato.

#### DESCRICAÇÃO DO INVENTO

A interleucina-4 cristalina deste invento é útil para a análise cristalográfica de raio X e para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento de qualquer condição médica susceptível de tratamento por interleucina-4.

Para ilustração da prática do presente invento, a forma matura de huIL-4 foi derivada de E. coli. Outros IL-4 assim como outras formas de rhuIL-4 podem ser identicamente utilizadas. A purificação de rhuIL-4 a partir do sobrenadante de células foi obtida por métodos cromatográficos convencionais (Le et al., acima). Experiências de difusão de gota de vapor suspensa foram realizadas em pratos de cultura de tecidos de 24 de fundo (Multi-fundo, Becton Dickenson & Co, Lincoln Park, NJ). Gotas (6  $\mu$ L) que contêm 20 mg/ml de huIL-4, 15 - 20 % de sulfato de amônio saturado, fosfato de sódio a 40 mM, pH 6,0 - 7,0, foram suspensas em tiras de cobertura siliconizadas invertidas em pratos de cultura de tecidos de 24 de fundo. Estas gotas foram equilibradas a 12 ou a 22°C contra 1 ml de 30 - 40 % de sulfato de amônio saturado, fosfato de sódio 40 mM, a pH 6,0 - 7,0. A incubação a temperatura controlada foi realizada em câmaras ambientais RBVCO pré-colocadas a 12° ou a 22°C.

A concentração de rhuIL-4 em vários tampões foi determinada espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção de 0,57/cm/mg/ml aos 278 nm. Electroforese em gel de

policrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o método de Laemmli [Nature 227:680 (1970)]. CLAR de fase invertida foi realizada numa coluna Rainim C4 (4,6 x 250 nm; Dynamax, 300 Angstrom) desenvolvida com um gradiente linear de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1 %. A determinação da actividade de poliferação das células T usando linfócitos de sangue periférico humano foi realizada como descrito previamente (Yokota et al., acima). Para estudos de raio X, grandes cristais tetragonais foram montados em capilares de vidro e fotografados com uma câmara de precisão aos 22°C, usando radiação CuK $\alpha$  de um ânodo de rotação Rigaku RU-300. Dados originais completos foram recolhidos num detector de área Nicolet X-100A, usando a mesma fonte de radiação.

Como indicado previamente, para fins de ilustração, a interleucina-4 humana cristalina descrita neste invento é interleucina-4 humana recombinante derivada de E. coli. A estrutura primária da proteína é :

	5	10	15	20	25	30
1	H K C D I T L Q E I I K T L N S L T E Q K T L C T E L T V T					
31	D I F A A S K N T T E K E T F C R A A T V L R Q F Y S H H E					
61	K D T R C L G A T A Q Q F H R H K Q L I R F L K R L D R N L					
91	W G L A G L N S C P V K E A N Q S T L E N F L E R L K T I M					
121	R E K Y S K C S S					

Usando sulfato de amónio como agente precipitante, rhIL-4 foi cristalizado em agulhas e em grandes cristais tetragonais. A cristalização pode ser melhor conseguida em tampão de fosfato de sódio 40 mM, pH 6,0, que contém 34 % de sulfato de amónio, depois de 21 dias de incubação aos 12°C. Os cristais tetragonais têm sido observados em fosfato de sódio a valores de

pH desde 5,0 a 7,0 e a concentrações de sulfato de amônio na gama desde 30 a 40 % da saturação.

A cristalização é realizada a uma gama de pH de 5 a 7, preferencialmente de 5,5 a 6,5 e mais preferencialmente a cerca de pH 6,0. A temperatura pode rondar desde os 5 aos 25°C, preferencialmente desde os 12 aos 22°C e mais preferencialmente os 12°C. A concentração de proteína no equilíbrio deve ser desde cerca de 5 a 60 mg/ml, preferencialmente de 30 a 50 mg/ml e mais preferencialmente a cerca de 40 mg/ml.

O período de incubação aos 12°C até os 22°C pode variar desde 2 a 20 dias. É de antecipar que os métodos de cristalização descritos aqui também são úteis para cristalização de derivados de rhuIL-4 a partir de outras células hospedeiras (e.g. células de mamíferos em cultura, levedura, insectos e outras) ou de huIL-4 derivado de fontes naturais (e.g. linfócitos do sangue periférico humano ou linhas de células humanas constitutivamente produzindo huIL-4). É também de antecipar que o método será aplicável a homólogos de proteínas de interleucina 4 derivado de outras espécies.

A rhuIL-4 cristalina a partir de gotas suspensas foi isolada e lavada totalmente em sulfato de amônio a 55 %, tampão de fosfato de sódio 40 mM, pH 6,6 à temperatura ambiente (22 - 25°C). Depois de redissolução em tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, com cloreto de sódio 0,15 M, os cristais exibiram actividade de poliferação de células T ( $2,0 \times 10^7$  unidades/g) que foi idêntica à da amostra de rhuIL-4 de controle que foi cristalizada. Quando sujeita a SDS-PAGE, a migração electroforética dos cristais de rhuIL-4 redissolvidos foi idêntica à da amostra de controle. Identicamente, o modelo de eluição de CLAR de fase invertida dos cristais redissolvidos foi indistinta do modelo de

eluição da amostra de controle. Nenhuma degradação de proteína foi aparente como um resultado do período longo de incubação, aos 22°C. Mais importante, o processo de cristalização seguido por redissolução em tampão fisiológico falhou na inativação da actividade de poliferação de células T de rhuIL-4.

Os dados de difracção de raio X foram inicialmente recolhidos a uma resolução de 2,7 Å usando o detector de área. Franjas de oscilação cobriram 0,25 e foram medidas durante 10 minutos. A indiciação e a integração dos dados foram realizados usando os programas de processamento XENGEN [Howard et al., J. Appl. Crystallogr. 20:383 (1987)]. Os dados indicidos no sistema tetragonal foram com  $a = 92,1$  (2),  $b = 92,1$  (7) e  $c = 46,5$  (1) Å. O grupo de espaço é ou  $P_4^2_12$  ou  $P4_3^2_12$ .

Fotografias de precisão de raio X subsequentes de interleucina-4 confirmam o grupo de espaço e ou os parâmetros de células unitárias. Os cristais tetragonais são estáveis ao raio X e difractam à temperatura ambiente, durante pelo menos cinco dias e difractam pelo menos a uma resolução de 2,7 Å.

A cristalização em grande escala pode ser conseguida por métodos equivalentes a difusão a vapor, nomeadamente, diálise e ultrafiltração. Cristais de semente obtidos a partir da experiência de gota suspensa, podem ser usados para acelerar a cristalização em grande escala desde que as condições óptimas tenham sido estabelecidas. Embora a utilização de sulfato de amónio como um agente precipitante seja preferido, pode ser substituído por outros sais de citrato e de sulfato como sulfato de sódio, potássio, cálcio ou de magnésio; citrato de sódio, e outros (McPherson, Preparation and Analysis of Protein Crystals, 1982, John Wiley & Sons, New York, New York). Cristalização em larga escala de rhuIL-4 pode ser introduzida como um passo de

purificação final e/ou passo de concentração na manufactura clínica. Armazenamento de longa duração da droga em massa rhuIL-4 numa forma cristalina é também altamente desejável, devido à estabilidade inerente dos cristais, quando comparada com rhuIL-4 armazenada numa solução com conservantes.

Os cristais preparados pelo método descrito também constituem uma forma particularmente vantajosa para preparação da forma de dosagem farmacêutica. Os cristais podem ser usados, por exemplo, como uma base para uma formulação de libertação retardada de rhuIL-4 in vivo. Acredita-se que complexos de metais (e.g. zinco ou ferro) e de huIL-4 possam ser formados e depois subsequentemente cristalizados. Cristais destes complexos podem também ser usados em formulações de proteína de libertação retardada que contêm aditivos farmacêuticos apropriados. Exemplos de formulações de proteína de libertação retardada idênticas são complexos cristalinos de zinco - insulina (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985, Gennaro, A.R., Ed., Mack Publishing Co., Fasten, Pennsylvania, pp 974 - 976) e o complexo cristalino zinco - insulina - protamina (Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia, 1989, Sittig, M., Ed., pp. 820 - 821).

Composições farmacêuticas de libertação retardada que compreendem a interleucina-4 cristalina do invento podem ser preparadas por mistura desta interleucina-4 com um agente de complexação de metal e/ou de proteína, como descrito acima.

REIVINDICAÇÕES

1ª. - Método para a produção de interleucina-4, caracterizado por compreender a incubação de interleucina-4 numa solução aquosa tamponada a pH 5-7 que compreende um sal sulfato ou citrato, durante um tempo suficiente de modo a permitir a formação de cristais de interleucina-4.

2ª. - Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado por os cristais de interleucina-4 produzidos serem cristais de interleucina-4 humana.

3ª. - Método de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado por os cristais de interleucina-4 produzidos serem cristais de interleucina-4 que é produzida através de técnicas de ADN recombinante.

4ª. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por os cristais de interleucina-4 produzidos serem cristais de interleucina-4 que é não glicosilada.

5ª. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por os cristais de interleucina-4 produzidos serem cristais de interleucina-4 que é glicosilada.

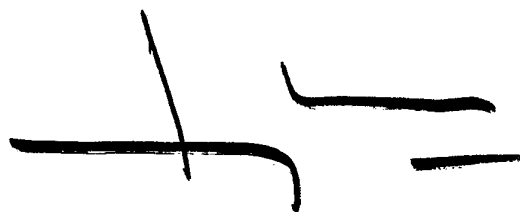
6ª. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por os cristais de interleucina-4 produzidos serem cristais de interleucina-4 que é produzida por E. coli.

7a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por a solução tamponada compreender sulfato de amónio a pH 6,0.

8a. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo interleucina-4 na forma cristalina, complexada com um metal e/ou um agente de complexação de proteína, caracterizado por compreender a mistura de interleucina-4 na forma cristalina com um metal e/ou um agente de complexação de proteína.

9a. - Método para o tratamento de um indivíduo que tenha uma condição médica susceptível de tratamento com a interleucina-4, caracterizado por compreender a administração a esse indivíduo de uma quantidade eficaz de interleucina-4 na forma cristalina.

Lisboa, 14 de Junho de 1991



**J. PEREIRA DA CRUZ**  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º  
1200 LISBOA