



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4213/83

(51) Int.Cl.5

C 07 K 3/20

(22) Indleveringsdag: 15 sep 1983

(41) Alm. tilgængelig: 17 mar 1984

(44) Fremlagt: 23 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 16 sep 1982 US 418927

(71) Ansøger: *F. Hoffmann-La Roche AG; Grenzacherstrasse 124; Basel, CH

(72) Opfinder: Alvin S. *Stern; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af humant interleukin

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: J. Exp. Med. 1562, 1982, 454-64.
J. Immunol Methods 55, 1982, 243-251.

(57) Sammendrag:

4213-83

Humant interleukin 2 i homogen form fremstilles ved, at

A. en opløsning af rått humant interleukin 2 lades passere gennem en reversfase højtryksvæskechromatografisøjle, der indeholder methyl- eller octylgrupper, som er covalent bundet til silicagel, idet det humane interleukin 2 holdes tilbage på søjlen, søjlen elueres under HPLC-betingelser med en pufret n-propanolgradient 0-60% (v/v), og fraktioner, som udviser humant interleukin 2-aktivitet samles i pulje, kombineret med, at

B. de i pulje samlede aktive fraktioner fra trin A lades passere gennem en reversfase højtryksvæskechromatografisøjle, der indeholder diphenylgrupper covalent bundet til silicagel, idet det humane interleukin 2 holdes tilbage på søjlen, søjlen elueres under HPLC-betingelser med en pufret n-propanolgradient 20-60% (v/v), og fraktioner, der udviser humant interleukin 2-aktivitet samles i pulje, og trin A og/eller trin B eventuelt gentages.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af homogent interleukin 2 (IL-2), som stammer fra inducerede human-maligne celler, og som er rensset til homogenicitet under anvendelse af flere reversfasevæskechromatografitrin. IL-2 fremstillet ved
5 fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremviser en højere grad af homogenicitet og aktivitet samt et højere udbytte sammenlignet med IL-2 fremstillet ifølge kendt teknik.

IL-2 er et opløseligt protein, som er i stand til at modulere lymfocytreaktivitet, og som tidligere er blevet fremstillet ved at
10 stimulere muse-, rotte- eller menneskelymfocytceller med et mitogen såsom phytohemagglutinin (PHA) og concanavalin A (Con A), jfr. fx Gillis et al., *Nature* 268, 1977, s. 154; *J. Immunol.* 120, 1978, s. 2027; *ibid.* 124, 1980, s. 1954; *ibid.* 125, 1980, s. 2570.

IL-2 rensset fra muse-, rotte- og humane normale T-lymfocytter har vist
15 sig at bevare forskellige typer biologisk aktivitet, herunder: 1) udtalt forøgelse af thymocytmitogenese; 2) fremmelse af langtidsformering *in vitro* af antigenspecifikke hjælper- eller dræber-T-cellelinier og 3) induktion af cytotoxisk T-lymfocyt (CTL) reaktivitet og plaque-dannende cellereaktioner i kulturer af nøgne musemiltceller. I
20 overensstemmelse hermed viser disse identificerede biologiske aktiviteter af IL-2, at IL-2 er nyttigt til forhøjelse af immunrespons og til at gengive immundeficiente T-cellepopulationer (nøgne musemiltceller) normale niveauer af celle- og humoral immunitet. Endvidere antyder disse resultater, at IL-2-dannelse og -respons er vigtige
25 parametre i immunologiske funktioner, der kan være nyttige i den kliniske diagnose af afvigende immunitet. Endvidere understreger det forhold, at humant IL-2 muliggør *in vitro* formeringen af antigenspecifikke humane, muse- og rotte-dræber-T-celler vigtigheden af humant IL-2 som forskningsreagens.

Selv om fremstillingen af humant IL-2 ud fra lectinstimulerede, humane milt- og perifert blodlymfocytkonditionerede medier er beskrevet af flere forfattere, medfører disse produktionskilder og -teknikker imidlertid svage koncentrationer af IL-2, idet rensning af IL-2 kræver fraktionering af store mængder konditionerede medier, som
35 indeholder IL-2 for at opnå kun meget små mængder human IL-2-aktivi-

tet. Som følge heraf har tilstrækkelige mængder koncentreret humant IL-2 ikke været tilgængelige til *in vivo* forsøg eller til effektiv undersøgelse af den endelige molekylkarakterisering deraf.

Gillis og Watson (*J. Exp. Med.* 152, 1980, s.1709-19) beskriver fremstillingen af humant IL-2 ved induktion af en malign neoplastisk cellelinie såsom Jurkat-FHCRC-linien med T-cellemitogen såsom PHA eventuelt i nærværelse af en phorbolester såsom phorbolmyristinacetat (PMA). Delvis rensning af IL-2 opnåedes ved en fremgangsmåde, som omfattede ammoniumsulfatudfældning/dialyse, gelfiltreringschromatografi (Sephadex® G-100), ionbytningschromatografi (DEAE-cellulose), fladleje-isoelektrisk fokusering og analytisk natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Størsteparten af IL-2's biologiske aktivitet blev elueret elektrophoretisk fra det proteinbånd (1 af 9-16 separate bånd, som iagttages på gelen), der har en molekylvægt på ca. 14.000 dalton. Se også Frank et al., *J. Immunol.* 127, 1981, s. 2361 og Watson et al., *Lymphokines* 6, 1982, s. 95, for en tilsvarende beskrivelse.

Mier og Gallo (*J. Immunol.* 128, 1982, s. 1122; *Lymphokines* 6, 1982, s. 137) beskriver rensningen af IL-2 ud fra normale lymfocytter, hvorved fås "et næsten homogent materiale" under anvendelse af præparativ SDS-gelelektrophorese som det sidste trin efter en række anionbytningschromatografi- og gelfiltreringsprocedurer. Deres produkt havde en molekylvægt på 13.000 ved SDS-PAGE og 20-25.000 ved gelfiltrering og et isoelektrisk punkt på 6,8. Dette materiale var meget ustabil selv ved -70°C og krævede tilsætning af bovint serumalbumin (BSA) eller polyethylenglycol for at bevare sin aktivitet.

Stadler og Oppenheim (*Lymphokines* 6, 1982, s.117) beskriver IL-2, der er rensset ud fra mononucleare perifere blodceller, mandel- og miltceller, der udviste ladningsheterogenitet efter rensning ved søjlechromatografi, gelfiltrering og elektrofokusering. Der fandtes 3 ladningsarter med et isoelektrisk punkt på 6,5, 7,2 og 8,2, og heterogeniteten kan muligvis tilskrives forskelle i graden af glycosylering.

- I Journal of Experimental Medicine, 156, 2, 1982, 454-64 er beskrevet en fremgangsmåde til oprensning af humant Interleukin-2 ved ammoniumsulfatfældning efterfulgt af ionbytningschromatografi, gelfiltrering og chromatografi på blue agarose og procion agarose. Det rensede
- 5 interleukin-2 havde en specifik aktivitet på 10^6 U pr. mg protein. Imidlertid er dette oprensede interleukin ikke homogent med hensyn til molekylær struktur, idet op til tre biologisk aktive proteinkomponenter kunne identificeres afhængig af de forhold, hvorunder IL-2-produktionen foregik.
- 10 I Journal of Immunological Methods, 55, 1982, 243-51 er beskrevet en fremgangsmåde til oprensning af humant Interleukin-2 ved ammoniumsulfatfældning evt. efterfulgt af neuraminidase behandling og ionbytningschromatografi på PBE og gelfiltrering. Imidlertid er dette IL-2 ikke homogent, og forfatterne anfører tillige (side 151, sidste af-
- 15 snit), at humant IL-2 vil være vanskeligt at oprense til homogenicitet.

- Endelig har Robb og Smith (*Mol. Immunol.* 18, 1981, s. 1087-94) isoleret TCGF (=IL-2) fra den humane T-leukæmicellelinie JURKAT, der var ensartet i ladning og størrelse. Det samme resultat er også
- 20 beskrevet af Robb et al. i *J. Exp. Med.* 184, 1981, s. 1455-74.

- Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er kendetegnet ved, at en opløsning af rått humant interleukin 2 lades passere gennem en reversfase højtryksvæskechromatografisøjle, der indeholder methyl- eller octylgrupper, som er covalent bundet til silicagel, idet det humane inter-
- 25 leukin 2 holdes tilbage på søjlen, søjlen elueres under HPLC-betingelser med en konventionel gradient af et med vand blandbart solvent, og fraktioner, som udviser humant interleukin 2-aktivitet samles i pulje, kombineret med, at de i pulje samlede aktive fraktioner fra trin A lades passere gennem en reversfasehøjtryksvæskechromatografisøjle, der indeholder diphenylgrupper covalent bundet til silicagel,
- 30 idet det humane interleukin 2 holdes tilbage på søjlen, søjlen elueres under HPLC-betingelser med en konventionel gradient af et med vand blandbart solvent, og fraktioner, der udviser humant interleukin 2-aktivitet samles i pulje. I de tilfælde, hvor det anvendte råpræ-

parat har et relativt lavt titer, kan det være nødvendigt at gentage ét eller flere af HPLC-trinene for at opnå rensning til homogenitet.

Rå IL-2-præparater fremstilles nemt ved at dyrke maligne humane neoplastiske celler såsom humane leukæmi- og lymphomaceller *in vitro* i et serumholdigt medium, som er beriget med forskellige tilsætningsstoffer. Kulturen stimuleres med et T-cellemitogen såsom PHA, hvorved der dannes en supernatant, som indeholder IL-2. Efter et vist tidsrum, dvs. ca. 24 timer efter inkubation, indsamles supernatanten og oparbejdes til rensning af IL-2 til en mere koncentreret form. Det er også ønskeligt at anvende en phorbol ester såsom PMA som induktionsmiddel enten alene eller sammen med et T-cellemitogen såsom PHA eller Con A for at forøge dannelsen af IL-2, jfr. Gillis et al., *J. Exp. Med.* 152, 1980, s. 1709.

Cellelinier, der kan anvendes til fremstilling af rått humant IL-2 omfatter forskellige T- og B-cellelinier samt forskellige T-lymphomacellelinier. Cellelinierne blev dannet enten ved spontan opståen, virusinfektion eller med et kemisk carcinogen. En foretrukken cellelinie til dette formål er identificeret af Gillis et al. som den Jurkat-FHCRC humane T-leukæmicellelinie, og fortrinsvis anvendes en subklon af denne linie med betegnelsen H33HJ-JAI. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan også anvendes til at rense IL-2, som stammer fra perifere blodlymfocytter.

Det dyrkningsmedium, som anvendes til at fremstille rått, humant IL-2 sammen med de ovennævnte cellelinier, kan bestå af kommercielt tilgængelige medier såsom Dulbecco's modificerede eagle-medium, RPMI-medium og Click's medium. Tilsætningsstoffer, som kan sættes til dyrkningsmediet hver for sig eller sammen, omfatter penicillin, streptomycin, gentamycin, frisk L-glutamin, HEPES-puffer, NaHCO_3 , fetalt kalveserum (FCS) eller normalt humant serum. Den indledende celledensitet af cellerne, især når der anvendes Jurkat-FHCRC-celler, vil være i området fra 5×10^5 celler/ml til 1×10^7 celler/ml, fortrinsvis ca. 1×10^6 celler/ml.

Dyrkningsbetingelserne omfatter en temperatur i området ca. 35-38°C, en pH-værdi i området 7,0-7,4 og en fugtig atmosfære med ca. 5-10%

carbondioxid i luften. En PHA-mitogenkoncentration i området 0,5-2,0 volumenprocent, fortrinsvis 1 volumenprocent, kan anvendes.

Den mængde IL-2, der dannes ved at stimulere maligne, humane celler med et plantemitogen, varierer med tiden. Spidsniveauer af IL-2 nås
5 ca. 16-24 timer efter stimulering med PHA. Assay af IL-2 til overvågning af celledyrkningsfremstillingsproceduren eller rensningsprocedurerne omfatter bedømmelse af prøvens evne til at inducere T-cellelinieformering. T-celleformering bestemmes ved at måle inkorporeringen af tritieret thymidin. En aktivitetsenhed defineres som det antal
10 mikroliter, der findes i en T-cellekulturbrønd, som inducerer 50% af den maksimale thymidininkorporering. Specifikke detaljer ved assayfremgangsmåden er beskrevet i Gillis et al., *J. Immunol.* 120, 1978, s. 2027.

Fremstilling af et hensigtsmæssigt udgangsmateriale til udførelse af
15 HPLC-rensningsstrinene ifølge opfindelsen omfatter udfældning af IL-2-holdige supernatanter, som fås ved centrifugering af høstede inducerede celler, ved tilsætning af ammoniumsulfat til 85%'s mætning. En sådan tilsætning udføres ved gradvis tilsætning af tørt ammoniumsulfat til supernatanten under nensom omrøring. Tilsætning af ammoniumsulfat til udfældning udføres over en længere periode, fx en
20 periode på 12 timer. Når der nås en mætning på 85%, fortsættes den nensomme omrøring i yderligere et tidsrum i kulde. Det udfældede protein pelleteres ved centrifugering, og pellets gensuspenderes i sterilt 2 gange destilleret vand.

25 I et alternativt fremgangsmådeaspekt udsættes det gensuspenderede rå IL-2 for ionbytningschromatografi. En hensigtsmæssig søjle til dette formål er CM Biogel A-harpiks (LKB-Produkter, Bromma, Sverige). Søjlen forbehandles fortrinsvis med en opløsning af fetalt kalveserum for at blokere ikke-specifikke bindesteder på harpiksen før påføring
30 af den IL-2-holdige prøve. Eluering fra søjlen udføres med en pufret saltgradient. En hensigtsmæssig gradient til dette formål er 50 mM-0,5M NaCl i HEPES, pH-værdi 5,5. En endelig vask med 0,5M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5, anvendes for at sikre, at al IL-2-aktivitet elueres.

I pulje samlede aktive fraktioner fra det ovennævnte ionbytningschromatografitrin giver et foretrukket udgangsmateriale til HPLC-procedurerne, som udgør fremgangsmådeaspektet af den foreliggende opfindelse. I en alternativ udførelsesform er det muligt, når der

5 foreligger en supernatant fra ammoniumsulfattrinet med et tilstrækkeligt højt titer, at anvende dette materiale direkte i det første HPLC-søjletrin. I et sådant aspekt kan det imidlertid være nødvendigt at gentage ét eller begge HPLC-trin for at opnå essentiel homogenitet i IL-2-produktet.

- 10 De HPLC-trin, der anvendes i den her omhandlede fremgangsmåde, gør brug af en reversfase, methyl-, octyl- eller diphenylbundet siliciumdioxidsøjle med en porestørrelse på mindst ca. 150 Å. Hensigtsmæssige reversfase HPLC-søjler til anvendelse ved udøvelse af opfindelsen findes i handelen. Særlig foretrukne søjler til dette formål er
- 15 søjler af Protesil-typen, som er kommercielt tilgængelige fra Whatman Separations Inc., Clifton, New Jersey, USA.

- Således er fx Whatman Protesil 300 Methyl en søjle, som består af trimethylsilylgrupper, som er covalent bundet ved hjælp af en silicium-oxygen-siliciumbinding til overfladen af en silicagel med en pore-
- 20 diameter på 300 Å, som er klassificeret til en gennemsnitlig partikelstørrelse på 8 µm. Tilsvarende har Whatman Protesil Magnum 9 Octyl- søjlen octylgrupper, som er covalent bundet til en silicagel med en porediameter på 150 Å, medens Whatman Protesil Diphenyl-søjlen har diphenylgrupper covalent bundet til overfladen af en silicagel
- 25 med en porediameter på 300 Å.

- Eluering af proteiner fra HPLC-søjlerne kan udføres på i og for sig kendt måde. En hensigtsmæssig elueringsfremgangsmåde til fjernelse af bundne proteiner fra methyl- eller octylsøjlerne, som anvendes i det første HPLC-trin i fremgangsmåden ifølge opfindelsen, omfatter an-
- 30 vendelse af en gradient med en gradvist stigende koncentration af en med vand blandbar lavere alkanol, fortrins n-propanol. En foretrukken gradient til dette formål er 0-60% v/v gradient i pyridin/eddikesyre, pH-værdi 4,0.

Tilsvarende elueringsbetingelser kan anvendes i forbindelse med diphenylsøjlen, som anvendes i det andet trin med undtagelse af, at alkanolgradienten er 20-60% v/v. Elueret protein kan hensigtsmæssigt overvåges med detektionssystemer, som er kendte inden for fagområdet, såsom anvendelse af et automatisk fluorescensdetektionssystem beskrevet af Kenny et al., *Methods Enzymol.* 78, 1981, s. 435.

Efter udførelse af HPLC-fremgangsmådetrinene, enten i 2 trin eller, hvor der anvendes et råprodukt med et lavt titer, med én eller to gentagelser af det første og/eller andet trin, fås IL-2, som er rensat til homogenitet som en enkelt symmetrisk spids af bioaktivitet i et godt udbytte.

Det forhold, at man er i stand til at fremstille homogent IL-2, gør det for første gang muligt at bestemme dette molekyles aminosyresammensætning. Denne oplysning kan på sin side føre til bestemmelsen af aminosyresekvensen, som igen er vigtig som hjælp til kloning af det humane IL-2-gen og den endelige fremstilling af store mængder rent rekombinant IL-2 til kliniske afprøvninger og i sidste instans til udbredt medicinsk anvendelse af dette stof. Endvidere muliggør tilgængeligheden af homogent IL-2 nøjagtige biologiske studier af dets aktivitet fri for forurening med de talrige lymphokinarter, der vides at blive dannet samtidig med IL-2 under induktionen. Medens den kendte teknik har hævdet at fremstille højtrensede eller næsten homogene IL-2-præparater, viser erfaringen, at når materiale, som angives at være enkeltbåndsmateriale ved SDS-PAGE analytisk elektrophorese, anvendes som udgangsmateriale i den her omhandlede HPLC-fremgangsmåde på en methyl- eller octylsøjle, opspaltes båndet i et stort antal proteinspidser, som ikke er forbundet med IL-2-aktiviteten. På grundlag af sådanne iagttagelser antages det, at sådanne præparater ikke er mere end 10% rene, og de kan i nogle tilfælde endog være mindre end 1% rene.

Tests med delvis rensede IL-2-præparater, der stammer fra Jurkat-FHCRC-cellelinien, viser, at det delvis rensede lymphokin ikke får friske perifere blodlymfocytter til at formere sig, men inducerer formering i T-lymfocytpopulationer, der forinden er stimuleret med lectiner eller specifikke antigener. Endvidere viste delvis rensat

humant IL-2 sig at opretholde formeringen af ikke alene humane anti-gen-specifikke effektor-T-celler, men også museantigen-specifikke effektor-T-celler. Således har selv delvis rensset Jurkat-FHCRC-dannet humant IL-2 vist sig at være et nyttigt reagens til anvendelse ved

5 dyrkning af klonale humane og muse-T-celler med forskellige antigener og effektorspecifikationer og er nu faktisk en handelsvare til sådanne anvendelser. Homogent IL-2 ifølge opfindelsen kan naturligvis anvendes på tilsvarende måde.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempel.

10 EKSEMPEL

IL-2-fremstilling

H33HJ-JAI-celler (ATCC nr. CRL-8163, deponeret den 26. august 1982), som er en klon af Jurkat-FHCRC-stamcellelinien, blev dyrket i RPMI 1640 medium beriget med 10% føtalt kalveserum, 50 U/ml penicillin, 50

15 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin og 300 $\mu\text{g/ml}$ frisk L-glutamin ved 37°C i fugtig atmosfære med 5% CO₂ i luft. Celler ved mætnings-tæthed ($8-10 \times 10^5$ celler/ml) blev høstet, centrifugeret og gensuspenderet i frisk RPMI 1640 medium uden serum, men indeholdende 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin og 300

20 $\mu\text{g/ml}$ frisk L-glutamin. Cellerne blev gensuspenderet til en koncentration på 2×10^6 celler/ml og stimuleret ved tilsætning af 1 volumenprocent PHA og 10 ng/ml phorbolmyristinacetat (PMA). Efter 24 timers inkubation ved 37°C i fugtig atmosfære med 5% CO₂ i luft, blev de inducerede celler høstet og centrifugeret, og supernatanten blev

25 holdt tilbage som rått udgangsmateriale.

I pulje samlede supernatanter fra 3 celledyrkninger (nr. 1-3), der hver omfattede 900 ml, 900 ml og 1050 ml eller ialt 2850 ml supernatant, idet det i pulje samlede materiale havde en samlet aktivitet på $7,125 \times 10^6$ enheder bestemt ved det af Gillis et al., *J. Immunol.*

30 120, 1978, s. 2027, beskrevne assay, blev behandlet ved gradvis tilsætning af tørt ammoniumsulfat til 85%'s mætning under nansom omrøring. Tilsætning af ammoniumsulfat til udfældning foretoges i

løbet af 12 timer. Da opløsningen havde nået 85%'s mætning, fortsattes den nænsomme omrøring ved 4°C i yderligere 24 timer. Det protein, der fandtes i supernatanten, blev pelleteret ved 30 minutters centrifugering ved 10.000 x G. Supernatanterne blev dekanteret og kastet bort. Pellet'en blev gensuspenderet til 40 ml med 2 gange destilleret sterilt vand, og den resulterende opløsning indeholdt 205.000 U/ml IL-2 eller i alt $8,2 \times 10^6$ enheder.

Yderligere forsøg blev udført som opsummeret nedenfor i tabel 1.

Tabel 1

10	Forsøg nr.	Supernatant- volumen (ml)	Aktivitet i puljen (U/ml)	Enheder i alt $\times 10^6$
15	4	1200	6500	9,425
	5	250		
	6	1200	6500	12,35
	7	700		

Tabel 1 fortsat

	Forsøg nr.	Gensuspensions- volumen (ml)	Aktivitet (U/ml)	Samlet aktivitet (U x 10 ⁶)
5	4	55	200.000	11
	5			
	6	80	163.840	13,107
10	7			

Ionbytningschromatografi på CM Biogel A-søjle

CM Biogel A blev ækvilibreret i 0,05 M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5. Søjlen (100 ml) blev pakket, hvorefter der tilsattes 100 ml 0,005 M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5, der indeholdt 10% føtalt kalveserum. Dette blev gjort for at blokere ikke-specifikke bindingssteder, som kunne binde humant-IL-2-aktivitet. Serumproteiner, der blev bundet til søjlen, blev derefter bortelueret ved tilsætning af 500 ml 0,5 M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5. Søjlen blev derefter genækvilibreret med 1000 ml 0,05 M NaCl.

Kombinerede gensuspensioner af ammoniumsulfatudfældet protein, der omfattede forsøg 1-5 som beskrevet ovenfor, blev hældt på CM-søjlen. Søjlen blev derefter vasket med 200 ml 0,05 M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5. En 500 ml saltgradient, der gik fra 50 mM til 0,5 M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5, blev derefter hældt på søjlen. Efter gradientpåføringen blev søjlen vasket med 200 ml 0,5 M NaCl-HEPES, pH-værdi 5,5, for at sikre, at alt bundet IL-2 faktisk var blevet elueret fra søjlen. Der vandtes fraktioner på hver 5 ml. Hver 3. fraktion blev undersøgt for IL-2-aktivitet. Spidsaktiviteten blev bestemt, og de aktive fraktio-

ner blev samlet i pulje. Man fik således en pulje på 36 ml med en aktivitet på 983.040 U/ml eller en samlet aktivitet på $35,39 \times 10^6$ enheder.

- Ved et andet CM-søjleforsøg med de gensuspenderede ammoniumsulfat-
- 5 bundfald fra de i pulje samlede forsøg 6 og 7 som beskrevet ovenfor fik man i pulje samlede fraktioner med et volumen på 215 ml, en aktivitet på 80.000 U/ml og en samlet aktivitet på $17,2 \times 10^6$ enheder. En 130 ml portion fra dette forsøg blev samlet med de 36 ml fra det første forsøg, hvilket gav 166 ml rå IL-2 med en samlet
- 10 aktivitet på $10,4 \times 10^6$ enheder, da det mælttes efter fremstillingen.

Reversfase HPLC med octylsøjle

- Portion A, der vandtes som beskrevet ovenfor, blev i sin helhed pumpet direkte på en 9,4 x 250 mm Protesil Magnum 9 Octyl-søjle (Whatman Separations Inc., Clifton, New Jersey). Søjlen blev derefter
- 15 vasket med 50 ml 0,9 M eddikesyre/0,2 M pyridinpuffer, pH-værdi 4,0. Eluering af proteinerne blev udført med en gradient af n-propanol 0-60% (v/v) i løbet af 8 timer i 0,9 M eddikesyre/0,2 M pyridinpuffer, pH-værdi 4. Et automatisk fluorescensdetektorsystem, der anvendte fluorescamin, overvågede proteinet i søjleeffluenterne. Udbyttet af
- 20 biologisk aktivitet var $7,13 \times 10^6$ enheder (ca. 70%).

Reversfase HPLC med diphenylsøjle

- Fraktionerne, der indeholdt hovedspidserne af aktivitet opnået fra octylsøjlen, blev samlet i pulje, fortyndet i forholdet 1:1 (v/v) med 0,9 M eddikesyre/0,2 M pyridin, pH-værdi 4,0, og pumpet over på en
- 25 4,6 x 250 mm Whatman Protesil Diphenyl-søjle. Proteiner blev elueret med en 20-60% (v/v) n-propanolgradient i 0,9 M eddikesyre/0,2 M pyridinpuffer, pH-værdi 4,0, i løbet af 6,5 timer. Denne fremgangsmåde gav en symmetrisk spids, der faldt sammen med IL-2-aktivitet. Udbyttet af aktivitet i dette trin var højere end 60%. Den essentiel-
- 30 le homogenitet af materialet blev bekræftet ved analytisk SDS-PAGE elektrophorese og todimensional gelelektrophorese, der gav henholdsvis et enkelt bånd og en enkelt plet. Det således vundne homogene,

humane IL-2 havde en specifik aktivitet på ca. $1,4 \times 10^9$ U/mg og et isoelektrisk punkt på 5,68.

Prøver af dette materiale blev underkastet aminosyreanalyse, der blev udført med fluorescamindetektion (jfr. Stein et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 1973, s. 203). Polypeptidet blev hydrolyseret i 24 timer og 48 timer ved 104°C i konstant kogende HCl indeholdende 0,1% thioglycolsyre. Resultaterne er vist nedenfor i tabel 2:

Tabel 2					
10		24 timer	24 timer	48 timer	IL-2's aminosyre-
					sammensætning
	Asp	12,3	11,8	11,8	12
	Thr	8,6	9,6	7,4	10
15	Ser	7,5	5,2	7,3	8
	Glu	18,3	15,4	16,0	16-17
	Pro	9,7	10,7	-	8-9
	Gly	7,5	6,3	10,8	8
	Ala	7,5	6,0	8,4	7
20	Cys				4-5*
	Val	5,0	5,5	5,2	6
	Met	4,3	3,3	3,1	4
	Ile	5,0	7,5	6,3	7
	Leu	13,7	19,4	16,0	16

	Tyr	2,4	1,7	4,2	3
	Phe	4,6	4,1	6,4	5
	His	4,4	3,8	4,9	4
	Lys	7,9	8,6	7,9	8
5	Arg	3,9	3,9	7,5	4
					I alt 130-133

* 24 timers hydrolyse på en separat prøve

- 10 Sekvensanalyse gav følgende interne partielle aminosyresekvens: Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu-Thr. Denne sekvens er konsistent med stillingerne 44-57 hos den formodede humane IL-2-sekvens foreslået af Taniguchi et al., *Nature* 302, 1983, s. 305-310, fra klonet cDNA.

15 PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af humant interleukin 2 i homogen form,

k e n d e t e g n e t ved, at

- 20 A. en opløsning af rått humant interleukin 2 lades passere gennem en reversfase højtryksvæskechromatografisøjle, der indeholder methyl- eller octylgrupper, som er covalent bundet til silicagel, idet det humane interleukin 2 holdes tilbage på søjlen, søjlen elueres under HPLC-betingelser med en konventionel gradient af et med vand blandbart solvent, og fraktioner, som udviser humant interleukin 2-aktivitet
- 25 tet samles i pulje, kombineret med, at

B. de i pulje samlede aktive fraktioner fra trin A lades passere gennem en reversfasehøjtryksvæskechromatografisøjle, der indeholder

diphenylgrupper covalent bundet til silicagel, idet det humane interleukin 2 holdes tilbage på søjlen, søjlen elueres under HPLC-betingelser med en konventionel gradient af et med vand blandbart solvent, og fraktioner, der udviser humant interleukin 2-aktivitet samles i pulje, og trin A og/eller trin B eventuelt gentages.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at det vundne homogene humane interleukin 2 er karakteriseret ved en specifik aktivitet på ca. $1,4 \times 10^9$ U/mg, et isoelektrisk punkt på ca. 5,68 og en aminosyresammensætning som følger:

Asp	12	Ala	7	Tyr	3
Thr	10	Cys	4-5	Phe	5
Ser	8	Val	6	His	4
Glu	16-17	Met	4	Lys	8
Pro	8-9	Ile	7	Arg	4
Gly	8	Leu	16		

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at søjlen i trin A er en octylsøjle.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3,

k e n d e t e g n e t ved, at silicagelen i octylsøjlen har en porestørrelse på ca. 150 Å og i diphenylsøjlen en porestørrelse på ca. 300 Å.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4,

k e n d e t e g n e t ved, at pufferen i trin A og B er 0,9 M edikesyre/0,2 M pyridin, pH-værdi 4,0.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at det rå humane interleukin 2 stammer fra inducerede, dyrkede humane maligne celler.