



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **335427**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 9/76 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20042908	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.12.10 PCT/EP2002/14005
(22)	Inng.dag	2004.07.09	(85)	Videreføringsdag	2004.07.09
(24)	Løpedag	2002.12.10	(30)	Prioritet	2001.12.10, US, 006223
(41)	Alm.tilgj	2004.07.09			
(45)	Meddelt	2014.12.15			
(73)	Innehaver	Baxter Healthcare SA, Hertisstrasse 2, CH-8306 WALLISELLEN, Sveits Artur Mitterer, Schwarzeckerweg 10, AT-2304 ORTH/DONAU, Østerrike Wolfgang Mundt, Florianigasse 57/1/2/6, AT-1080 WIEN, Østerrike Christa Tauer, Geblergasse 66/15, AT-1170 WIEN, Østerrike Manfred Reiter, Gebrueder-Lang-Gasse 11/17, AT-1150 WIEN, Østerrike			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Renset preparat av Streptomyces griseus-trypsin og anvendelse derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	Yokosawa H et al. Affinity chromatography of trypsin and related enzymes. Part 3. Purification of Streptomyces-griseus trypsin using an affinity adsorbent containing a tryptic digest of protamine as a ligand. Journal of biochemistry. 1976, Vol. 79, No. 4, side 757-763. US 4973554 A Ito N. et al. High-performance affinity chromatography of trypsin on asahipak GS-gel coupled with p-aminobenzamidine. Journal of chromatography. 1985, Vol. 333, No. 1, side 107-114. Shimura K and Kasai K-I. Introduction of w-carboxyl spacer onto cross-linked agarose gel beads by o-alkylation for the preparation of affinity adsorbents. Journal of chromatography. 1984, Vol. 315, side 161-166. WO 0048635 A EP 0391400 A			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter for isolering og rensing av Streptomyces griseus-trypsin (SGT) fra pronase i ett enkelt affinitetskromatografitrinn og anvendelser av det rensede SGT.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot et rensed preparat av *Streptomyces griseus*-trypsin (SGT) fra pronase i ett enkelt affinitetskromatografitrinn og anvendelser av det rensede SGT.

5

Oppfinnelsens område

Trypsin er en serinprotease som finnes i fordøyelsessystemet til et bredt utvalg av pattedyr. Dets funksjon er den hydrolytiske kløyvingen av peptidbindinger, som dermed reduserer størrelsen til store proteiner og gjør dem tilgjengelige for videre degradering ved hjelp av andre proteaser. Trypsin blir benyttet i bioteknologiske applikasjoner, spesielt ved dyrkingen av pattedyrceller, der det benyttes som et redskap for å bryte ned store celleaggregater eller for å fjerne celler fra overflater slik som mikrobærere eller dyrkingsskåler. Trypsin blir også benyttet som et proteinnedbrytende enzym i prosesseringen av biopolymerer som ikke er sensitive overfor trypsin. På grunn av sin velkjente spesifisitet blir trypsin også benyttet som et selektivt proteinkløyvingsredskap i både analytiske og preparative prosesser. Trypsin kan bli inaktivert eller hemmet med et antall spesifikke eller uspesifikke proteasehemmere, der mange av disse tilhører serpinfamilien. Den som er mest utbredt benyttet i bioteknologiske applikasjoner er en trypsinhemmer fra soyabønner. Siden de fleste av disse trypsinhemmerene er svært spesifikke er de ikke aktive mot andre kontaminerende proteaser.

Trypsin blir typisk fremskaffet fra duodenalkjertlene til ulike dyrearter og rensed til ulike renhetsgrader. Rensingen av trypsin kan bli utført ved hjelp av et antall ulike biokjemiske prosesser inkludert presipitering, ionebytterkromatografi og affinitetskromatografi. Det har blitt vist at forhåndsrensed bovint trypsin (type-I) binder til benzamidin som er immobilisert på en uløselig bærer og kan bli eluert med høye konsentrasjoner av guanidin eller arginin eller ved å senke pH-verdien i elueringsmiddelet (Ellouali et al., 1991, Chromsymp. 2215:255-265). Pankreas hos pattedyr, fra hvilken trypsin er utvunnet, inneholder også serinproteasen chymotrypsin, som er svært lik trypsin når det gjelder dens fysiokjemiske egenskaper, inkludert interaksjonen med og affiniteten for amidinderivater. Som et resultat av dette er det vanskelig å separere disse to proteinene. Avhengig av rensefremgangsmåten kan derfor rensede trypsinpreparater inneholde varierende mengder med kontaminerende enzymer og da spesielt chymotrypsin. Videre kan trypsin som er fremskaffet fra pattedyr inneholde tilfeldige tillegg slik som virus og prioner. Helt siden oppdagelsen av virkningen av TSE-midler, og muligheten for deres overføring til mennesker, har det foregått en diskusjon omkring anvendelsen av stoffer som er fremskaffet fra mennesker eller dyr i bioteknologiske prosesser som tilveiebringer farmasøytiske midler som skal benyttes på mennesker.

Pronase, som er en protease fra mikrobeorganismen *Streptomyces griseus* (S.g), er et kommersielt tilgjengelig alternativ til trypsin som er fremskaffet fra vev fra dyr. Pronase

har blitt benyttet i fremstillingen av primære cellekulturer fra vev og til løsgjøring av celler fra overflater, mikrobærercellekulturer og vekst av VERO-celler i suspensjon i serumfritt medium (Weinstein 1966, Exper. Cell Res. 43:234-236, Manousos et al., 1980, In vitro 16:507-515, Litwin 1992, Cytotechn. 10:169-174). Den eksakte mekanismen for dens virkning er ikke kjent. Pronase er kjent for å være en blanding av ulike enzymer inkludert ulike typer av endopeptidaser, (serin- og metalloproteaser), eksopeptidaser (karboksypeptidase og aminopeptidase), nøytral protease, chymotrypsin, trypsin, karboksypeptidase, aminopeptidase og nøytral og alkalisk fosfatase.

Etter enzymlbehandling blir vanligvis aktiviteten til trypsin nøytralisert ved tilsetningen av føtalt kalveserum som inneholder et antall spesifikke og uspesifikke proteasehemmere. Medium som er fritt for serum og protein (spesielt fra pattedyrkilder) er likevel foretrukket i cellekulturmedium som benyttes for fremstilling av vaksineproteiner og terapeutiske proteiner. Anvendelse av serumfritt medium, som mangler enhver tryptsinhemmeraktivitet, gjør det derfor nødvendig å identifisere nye kilder for hemmeraktivitet. Fordi pronase er en blanding av en rekke ulike proteaser krever hemming av proteaseaktivitet en blanding av ulike hemmere, noe som fører til en svært kompleks og kostnads-krevende prosess. Proteinmengden som er et resultat av anvendelse av pronase og preparatet av hemmere i en serumfri kultur vil derfor være mye større sammenlignet med en kultur der det er benyttet trypsin fra pattedyr og en spesifikk tryptsinhemmer. Tilsetningen av pronase til kulturmediet vil videre skadelig påvirke renseprosessen fordi mer protein er til stede i mediet.

Den tryptsinlike aktiviteten til pronase, vanligvis kjent som *Streptomyces griseus*-tryptsin (SGT), viser en sekvensidentitet på omtrent 33 % med bovint tryptsin (Olafson et al., 1975, Biochem. 14:1168-1177). *Streptomyces griseus*-tryptsin har blitt renset ved hjelp av kromatografiske teknikker ved å benytte ulike typer av ionebytterresiner. Disse fremgangsmåtene benytter typisk stabile matriser som minimaliserer problemet med lekkasje av liganden over i produktet under elueringen. Disse fremgangsmåtene har likevel relativt liten selektivitet, noe som fører til rensefaktorer i området <10. Som et resultat av dette må flere trinn kombineres for å oppnå en høy grad av renhet, noe som igjen kan føre til at tryptsinet fordøyer seg selv og dermed tap av aktivitet. Rensing ved hjelp av ionebytterkromatografi på CM-Sephadex, med ytterligere rensing utført med rekromatografi på en ionebytterkolonne, har blitt beskrevet av Jurasek et al. (1971, Can. J. Biochem. 49:1195-1201) og av Olafson et al. (1975a, Biochem. 14:1168-1177, 1975b, Biochem. 14:1161-1167). Miyata et al. (1991, Cell Structure and Function, 16:39-43) beskriver en tretrinns kationbytterkromatografiprosess for å rense SGT. SGT er funnet å vandre som ett enkelt bånd på PAGE med en molekylvekt på omtrent 30 000 og med en esteraseaktivitet som er høyere enn for bovint tryptsin slik som bestemt ved hjelp av BAEE-analyse. Til og med SGT som var renset ved hjelp av tretrinnskromatografirensingsfremgangsmåter ble funnet å være noe kontaminert med karboksypeptidase-B-liknende aktivitet.

SGT har også blitt rensset fra pronase ved hjelp av affinitetskromatografi ved å benytte oligopeptider som er avledet fra tryptisk fordøyning av salmin som høyt spesifikke ligander for SGT. Eluering av den trypsinlike aktiviteten fra blandingen av protease i pronase med HCl avslørte rensset SGT som likevel ble funnet å være kontaminert med karboksy-peptidase-B-liknende aktivitet (Kasei et al., 1975, J. Biochem. 78:653-662, Yokosawa et al., 1976, J. Biochem. 79:757-763). For kun analytiske formål ble SGT også separert fra pronase ved hjelp av affinoforesse ved å benytte benzamidin som en ligand (Shimura et al., 1982, J. Biochem, 92:1615-1622).

I tillegg beskriver Ito et al. (Journal of Chromatography, vol. 333, nr. 1, 1985, side 107-114) fremstilling av en adsorbent for høy-ytelse affinitetskromatografi av trypsins og Yokosawa et al. (Journal of Biochemistry, vol. 79, nr. 4, 1976, side 757-763) beskriver utviklingen av en fremgangsmåte for rensing av *Streptomyces griseus* trypsin fra pronase ved hjelp av affinitetskromatografi. Videre beskriver Kanamori et al. (Journal of Chromatography, vol. 363, nr. 2, 1986, side 231-242) fremgangsmåter for lav- og høy- ytelse væske-affinitetskromatografi av proteaser i trypsin-familien ved hjelp formyl-bærere, og Shimura et al. (Journal of Chromatography, vol. 315, 1984, side 161-166) beskriver en fremgangsmåte for rensing av *Streptomyces griseus* trypsin fra pronase via affinitets-kromatografi ved bruk av p-aminobenzamidin som en ligand. WO 00/48635 beskriver et faktor-VIII preparat formulert uten albumin, som blant annet omfatter, med unntak av faktor-VIII, 1 % til 4 % av et stabiliseringsmiddel valgt fra gruppen bestående av sukrose, trehalose, raffinose, og arginin, og EP-A-0391400 beskriver et stabilt, tørket preparat av en urokinase-forløper og en fremgangsmåte for å stabilisere urokinase forløpere.

Det foreligger et behov for en enklere storskalafremgangsmåte for isolering og separering av den aktive trypsinlike fraksjonen fra pronase. Dette vil åpne for et kontrollert system til anvendelse i cellekultur fremgangsmåter og tilveiebringe en definert aktivitet i fraksjonen fra en mikrobekilde som ikke vil omfatte risikoen med kontaminanter av humane patogener.

Det foreligger også et behov for å unngå kontaminanter som er avledet fra tilsetningsstoffer til cellekulturmedium under celledeling/-vekst, biomasseproduksjon og produktfremstillingsprosesser. Reduksjon av proteinmengden i et cellekulturmedium vil tillate fremstilling av svært rene proteinprodukter ved å benytte konvensjonelle rensefremgangsmåter.

Oppsummering av oppfinnelsen

Det er derfor et mål for foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et preparat av rensset SGT som har høy spesifikk aktivitet.

Det er et annet mål for oppfinnelsen å tilveiebringe anvendelse av rensset SGT i bioteknologiprosesser.

Det er et annet mål for oppfinnelsen å tilveiebringe anvendelse av rensset SGT for fremstilling av virus eller virusantigen.

Det er også et mål for oppfinnelsen å tilveiebringe anvendelse av rensset SGT for fremstilling av biologiske produkter med celler passert og videredyrket med kun rensset SGT.

5

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1 viser SDS-PAGE av ionebytterkromatografi med spor 1: Eluat fra ionebytterkromatografering ifølge eksempel 1A og spor 2: rensset SGT etter eluering med 1 M arginin fra affinitetskromatografering ifølge eksempel 1B.

10 Fig. 2 viser SDS-PAGE av urensset *Streptomyces griseus*-pronase og rensset SGT, med spor 1: urensset pronase, spor 2: strømning gjennom affinitetskromatograferingen, og spor 3: rensset *Streptomyces griseus*-trypsin etter affinitetskromatografering og eluering med 1 M arginin.

Fig. 3 viser Western-blot-analyse av to ulike omganger med rensset SGT etter 15 affinitetskromatografi og eluering med 1 M arginin.

Fig. 4 viser kromatogrammet for reversfase-HPLC av rensset SGT.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

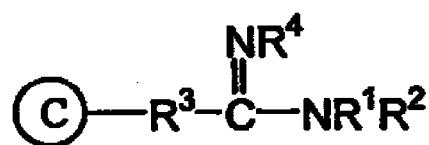
Foreliggende oppfinnelse gjelder et rensset preparat av *Streptomyces griseus*-trypsin 20 (SGT) som har en renhet på minst 95 % med hensyn til kontaminering/forurensning med andre proteaser og videre omfatter arginin i en konsentrasjon på 0,5 M til 1,2 M kjennetegnet ved at preparatet er fremskaffet ved hjelp av en fremgangsmåte som omfatter å kontakte Pronase proteasen med en immobilisert affinitetsenhet som omfatter benzamidin, og selektivt eluere SGT'et fra den immobiliserte affinitetsenheten med en elueringsløsning 25 som omfatter arginin i en konsentrasjon på 0,5 M til 1,2 M, hvor det rensede preparatet av SGT har en spesifikk aktivitet på minst omtrent 25×10^3 U/mg protein, hvor den spesifikke aktiviteten er målt ved anvendelse av N-benzoyl-L-argininetyl ester (BAEE) i Tris-buffer pH 8.0, 20 mM CaCl₂ ved 25 °C som et substrat.

Et mål for oppfinnelsen er å tilveiebringe et rensset preparat av *Streptomyces* 30 *griseus*-trypsin (SGT). Fremgangsmåtene beskrevet her er nyttige for storskalarensingen av SGT og tilveiebringer i noen utførelsesformer, som benytter et fysiologisk akseptabelt elueringsmiddel, et stabilt SGT-preparat som er klart for bruk til ulike bioteknologiske prosesser.

I en utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot et rensset preparat av SGT 35 ved hjelp av ett enkelt kromatografitrinn ved å kontakte pronasen med en immobilisert affinitetsenhet (for eksempel som inneholder amidin, guanidin eller amin) og selektivt eluere trypsinet fra kolonnen med et medlem av de samme klassene av forbindelser som blir benyttet som affinitetsenheten. Elueringsmiddelet virker som et konkurrerende middel på

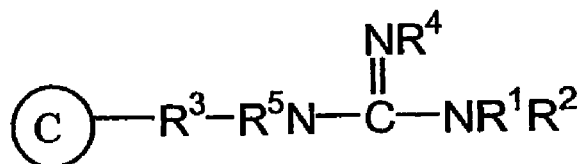
affinitetsenheten som er immobilisert på bæreren for SGT. I noen utførelsesformer er dermed elueringsmiddelet valgt for å ha høyere affinitet for SGT enn affinitetsenheten.

Ifølge noen utførelsesformer av oppfinnelsen blir pronasen kontaktet med en immobilisert affinitetskolonne som inkluderer et amidin. Slik som det benyttes her inkluderer uttrykket "amidin" amidin og derivater derav (for eksempel der hydrogenatomet som er bundet til amidinonitrogenet (=NH) blir erstattet med substituerte eller usubstituerte alkylgrupper, substituerte eller usubstituerte heteroalkylgrupper, substituerte eller usubstituerte arylgrupper og substituerte eller usubstituerte heteroarylgrupper). I disse utførelsesformene har amidinet strukturen:



der sirkelen som inneholder "C" representerer en komponent på kolonnen eller annen fast bærer. Symbolene R^1 , R^2 og R^4 er hver og en medlemmer som uavhengig er valgt fra H, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl og substituerte eller usubstituerte heteroarylgrupper. R^3 kan være enten til stede eller fraværende og kan ha enhver av identitetene som er fremlagt ovenfor med unntak av H. Representative amidinderivater inkluderer substituerte eller usubstituerte benzamidinerheter. Amidiner som kan bli benyttet inkluderer benzamidinhydroklorid, p-aminobenzamidindihydroklorid, bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)-metan, a,a'-bis(4-amidino-2-jodfenyl)-p-xylen, 1,2-bis(5-amidino-2-benzofuranyl)-etan og 6-amidino-2-(4-amidino-fenyl)-benzo-[β]tiofen.

I andre eksempler på utførelsesformer er affinitetsenheten en guanidin. Slik som det benyttes her inkluderer uttrykket "guanidin" guanidin og derivater derav (for eksempel der hydrogenatomet som er bundet til amidinonitrogenet (=NH) er erstattet med substituerte eller usubstituerte alkylgrupper, substituerte eller usubstituerte heteroalkylgrupper, substituerte eller usubstituerte arylgrupper og substituerte eller usubstituerte heteroarylgrupper). I disse utførelsesformene har guanidinderivatet strukturen:



der sirkelen med den innsatte "C" representerer en komponent på kolonnen eller annen fast bærer. R^1 , R^2 og R^4 er hver og en medlemmer som uavhengig er valgt fra H, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl og substituerte eller usubstituerte heteroarylgrupper. R^3 kan være enten til stede eller fraværende og kan ha enhver av identitetene som er fremlagt ovenfor med unntak av H. Representative guanidininneholdende enheter inkluderer guanidineddiksyre og derivater

derav, substituert eller usubstituert guanidinbenzoesyre, arginin og analoger derav (for eksempel som er derivatisert på karboksylgruppen eller α -aminogruppen).

I ytterligere andre eksempler på utførelsesformer er affinitetsenheten en amin-inneholdende enhet. Eksempler på amininneholdende enheter til bruk i utførelsen av foreliggende oppfinnelse inkluderer aminosyrer og aminosyreanaloger (for eksempel som er derivatisert på karboksylgruppen eller α -aminogruppen). Representative aminosyrer til bruk i oppfinnelsen er lysin, et derivat derav, ϵ -aminokapronsyre og liknende.

Uttrykket "alkyl" i seg selv, eller som en del av en annen substituent, betyr, dersom ikke annet er redegjort for, en rett eller forgrenet kjede, eller syklisk hydrokarbonradikal, eller en kombinasjon derav, som kan være fullstendig mettet, mono- eller polyumettet og kan inkludere di- og multivalente radikaler, som har antallet karbonatomer angitt (d.v.s., C_1 - C_{10} betyr ett til ti karboner).

"Alkyl" omfatter slik som det blir benyttet her også "alkylen"-grupper. Uttrykket "alkylen", i seg selv eller som en del av en annen substituent, betyr et divalent radikal som er avledet fra et alkan, slik som for eksempel $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, og inkluderer videre de gruppene som er beskrevet nedenfor som "heteroalkylen". En alkylgruppe (eller alkylen-gruppe) vil typisk bestå av 1 til 24 karbonatomer, der de gruppene som har 10 eller færre karbonatomer er foretrukket i foreliggende oppfinnelse. En "lavere alkyl" eller "lavere alkylen" er alkyl- eller alkylengruppe med en kortere kjede som generelt bestå av åtte eller færre karbonatomer.

Uttrykket "heteroalkyl", i seg selv eller i kombinasjon med et annet uttrykk, betyr dersom ikke annet er spesifisert, en stabil rett eller forgrenet kjede, eller syklisk hydrokarbonradikal, eller kombinasjoner derav, som bestå av det angitte antall karbonatomer og minst ett heteroatom som er valgt fra gruppen som bestå av O, N, Si og S, og der nitrogen- og svovelatomet eventuelt er oksidert og nitrogenheteroatomet eventuelt er kvart rnisert.

Uttrykket "aryl" betyr, hvis ikke annet er oppgitt, en polyumettet, aromatisk, hydrokarbonsubstituent som kan være en enkelt ring eller flere ringer (helst fra 1 til 3 ringer) som er fusjonert sammen eller forbundet kovalent. Uttrykket "heteroaryl" refererer til arylgrupper (eller ringer) som inneholder fra ett til fire heteroatomer som er valgt fra N, O og S der nitrogen- og svovelatomet eventuelt er oksidert, og der nitrogenatomet/-atomene eventuelt er kvart rnisert. En heteroarylgruppe kan være koplet til resten av molekylet via et heteroatom. Substituenten for hver av de ovenfor nevnte aryl- og heteroarylring-systemene er valgt fra gruppen av akseptable substituenten beskrevet nedenfor.

Som påpekt ovenfor er elueringsmiddelet det samme som eller en analog av affinitetsenheten som er benyttet. Elueringsmiddelet vil typisk ha større affinitet for SGT enn affinitetsenheten på kolonnen. I noen utførelsesformer er elueringsmiddelet arginin. Konsentrasjonen av elueringsmiddelet (for eksempel arginin) i elueringsløsningen er vanligvis minst omtrent 0,5 M. Det har blitt funnet at konsentrasjoner mellom omtrent 0,5 M og omtrent 1,2 M i elueringsløsningen tilveiebringer et SGT-preparat som har en høy renhet.

Mest foretrukket er en konsentrasjon mellom omtrent 0,8 M og omtrent 1,0 M. Utbyttet som oppnås med fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen er høyere sammenlignet med fremgangsmåter for ionebytterkromatografi fra kjent teknikk.

I den tilveiebrakte fremgangsmåten for å oppnå et rensset preparat av SGT blir SGT selektivt rensset fra en blanding av ulike proteaser, der noen av dem, spesielt chymotrypsin, har liknende fysiokjemiske karakteristika som er vanskelig å separere med kjente fremgangsmåter. Ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, ved å benytte arginin i en konsentrasjon på mellom omtrent 0,5 M og omtrent 1,2 M i elueringsløsningen, blir likevel SGT selektivt separert fra andre proteaser i pronaseblandingen.

Elueringsløsningen omfatter typisk arginin som elueringsmiddelet og kan ha en pH på mellom omtrent 4,0 og omtrent 9,0, helst mellom omtrent pH 5,0 og omtrent 7,0. Andre amidinavlede analoger som kan bli benyttet inkluderer analoger av arginin slik som de som er modifisert på karboksylenden av molekylet (se for eksempel Kasai, K. (1992) *Journal of Chromatography* 597, 3-18), peptider som inneholder arginin som den C-terminale aminosyren slik som leupeptin, pepstatin (se for eksempel Ksai, referert ovenfor), lysin eller analoger av lysin og peptider som inneholder lysin som den C-terminale aminosyren, sulfametoksazolum og derivater derav (se for eksempel Wu, X. og Liu, G. (1996) *Biomedical Chromatography* 10, 228-232), benzamidin og dens analoger som er modifisert på m- og/eller p-posisjonen, og guanidin og derivater derav (se for eksempel Ellouali, et al., (1991) *Journal of Chromatography* 548, 25-265).

Elueringsløsningen kan videre omfatte et uorganisk salt. Det uorganiske saltet kan være et salt av natrium, fosfat eller sulfat. Generelt er et natriumsalt slik som NaCl foretrukket. Det uorganiske saltet kan foreligge i en konsentrasjon på mellom omtrent 0,1 M og omtrent 1 M. En konsentrasjon på mellom omtrent 0,5 M og omtrent 1,0 M i elueringsmiddelet er foretrukket.

Fremgangsmåten for å oppnå et rensset preparat av SGT ifølge oppfinnelsen blir hensiktsmessig utført på en affinitetskromatografikolonne. Enhver matriks, på hvilken affinitetsenheten kan bli bundet, kan bli benyttet som bærer av affinitetsenheten. En slik matriks eller bærer kan bli valgt fra agarose, slik som Sepharose (Pharmacia), porøse partikler eller kuler slik som Poros (Applied Biosystems) eller Toyopearl (Tosohaas) eller andre bærere basert på cellulose, dekstran, akrylat eller silikat.

I fremgangsmåtene for å oppnå et rensset preparat av SGT ifølge oppfinnelsen er det foretrukket at pronasen er løseliggjort. Løsningsmiddelet kan være en buffer der bufferløsningen kan være en Tris-HCl-buffer, fosfatbuffer eller sulfatbuffer. Bufferen kan eventuelt omfatte et salt slik som natriumsalter. Bufferen har foretrukket en pH mellom omtrent 6,0 og omtrent 8,0. Pronasen blir kontaktet med bærermatriksen og SGT blir selektivt eluert ved hjelp av konkurrerende eluering, der arginin typisk blir benyttet.

Når arginin benyttes som elueringsmiddel foreligger det rensede SGT som er fremskaffet ved hjelp av denne fremgangsmåten i en løsning som omfatter omtrent 0,5 M til

omtrent 1,2 M arginin. En fordel ved denne utførelsesformen er at ingen stabiliseringsmidler må tilsettes på grunn av de stabiliserende egenskapene til elueringsmiddelet (for eksempel arginin) i løsningen. Det rensede SGT kan derfor bli lagret uten noen ytterligere stabiliserende midler i væsken. SGT fremskaffet ved hjelp av fremgangsmåten har en renhet på minst omtrent 95 %, helst minst omtrent 98 %, og er i all hovedsak fritt for andre enzymer slik som for eksempel chymotrypsin.

I en utførelsesform, der elueringsmiddelet ikke er fysiologisk akseptabelt, blir elueringsmiddelet fjernet fra det rensede SGT. Enhver av et antall standardfremgangsmåter blir benyttet til dette formålet. Slike fremgangsmåter inkluderer dialyse eller ultrafiltrering ved å benytte membraner med hensiktsmessig molekylvektbegrensning for å tillate elueringsmidlene å passere gjennom mens SGT holdes tilbake. Slike membraner er velkjente og kan bli fremstilt fra regenerert cellulose, PVDF, polyetersulfoner og liknende. Ulike kromatografiteknikker som utnytter molekylære forskjeller slik som størrelse, ladning, hydrofobisitet, affinitet og liknende blir også fordelaktig benyttet. Andre fremgangsmåter for å oppnå et rensed preparat av SGT involverer presipitering av enten elueringsmiddelet eller SGT og drar nytte av de ulike løselighetsegenskapene til elueringsmiddelet sammenlignet med SGT. Når høyaffinitetselueringsmidler blir benyttet må elueringsmiddelet generelt først bli separert fra SGT før middelet kan bli fjernet. Dette blir typisk utført ved å endre miljøparametere slik som pH, ionestyrke, temperatur, dielektrisitetskonstant og liknende. Slike fremgangsmåter er også velkjente på fagområdet.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre preparater av rensed SGT som har en renhet på minst omtrent 95 %. Ofte omfatter det rensede preparatet arginin i en konsentrasjon på minst omtrent 0,6 M arginin. SGT-preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse har en spesifikk aktivitet på minst omtrent 25×10^3 U/mg protein. Den spesifikke aktiviteten er foretrukket minst omtrent 40×10^3 U/mg protein.

Et preparat ifølge oppfinnelsen er typisk stabilt ved romtemperatur i en løsning på mellom omtrent 0,5 M til omtrent 1,2 M arginin i minst 2 uker og ved 4 °C i minst 4 uker. Ved lengre lagring kan preparatet bli holdt nedfrosset eller kan bli lyofilisert.

Som benyttet her betyr "stabil" at minkningen i spesifikk aktivitet i det opprinnelige preparatet av SGT som er fremskaffet direkte ved eluering fra affinitetsbærer er mindre enn 5 % ved romtemperatur per 24 timer.

"Renset preparat av SGT" betyr et preparat som har en renhet på minst omtrent 95 % slik som dette blir bestemt ved hjelp av Western-blot-analyse og HPLC. Renheten til SGT kan også bli bestemt ved å måle gjenværende aktivitet av chymotrypsin i preparatet. Mulig restaktivitet som skyldes chymotrypsin i preparatet blir bestemt ved hjelp av chymotrypsin-spesifikk enzymtest. Disse analysene kan bli utført som for eksempel beskrevet i eksempel 1. Hvis testresultatene ikke viser påvisbar chymotrypsinaktivitet i preparatet blir preparatet definert som fritt for chymotrypsinaktivitet.

"Spesifikk aktivitet" kan bli bestemt ved hjelp av et antall fremgangsmåter. Ett eksempel er en spesifikk trypsinaktivitetstest slik som esteraseaktivitet med et spesifikt substrat slik som N-benzoyl-L-argininetyl ester (BAEE) eller N-benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginin-p-nitroanilidhydroklorid (S222). Disse analysene blir for eksempel utført som beskrevet i eksemplene 1 og 2.

"Spesifisitet" betyr den spesifikke hemmingen av det rensede SGT med en trypsin-spesifikk hemmer. Trypsinhemmeren kan stamme fra en plante- eller dyrekilde slik som trypsinhemmer fra soyabønner eller eggehvite fra hønseegg.

Som kontroll for alle enzymatiske analyser kan rensed, kommersielt tilgjengelig trypsin fra svin eller storfe bli benyttet.

Når det benyttes et fysiologisk akseptabelt elueringsmiddel slik som arginin er fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen effektive og enkle fordi kun ett enkelt kromatografisk trinn er nødvendig for å fremskaffe et svært rent preparat av SGT. Preparatet er stabilt i elueringsmiddelet og kan bli lagret i løsningen uten vesentlig tap av enzymatisk aktivitet. Med denne fremgangsmåten blir rensed SGT i godt utbytte, med høy spesifikk aktivitet og renhet fremskaffet.

Oppfinnelsen tilveiebringer et rensed preparat av SGT tilveiebragt ved å selektivt adsorbere enzymet på en affinitetsenhet (for eksempel benzamidin) og eluere intakt SGT ved hjelp av konkurrerende eluering med en analog av affinitetsenheten (for eksempel arginin). Ved å benytte den svært skånsomme fremgangsmåten med konkurrerende eluering blir lekkasje av liganden, slik som benzamidin, over i sluttproduktet unngått. Det store overskuddet av elueringsmiddelet, for eksempel arginin, hemmer videre den autokatalytiske aktiviteten til enzymet ved å unngå autofordøyning under fremstilling og lagring og opprettholder et stabilt rensed produkt. En annen fordel er at sluttproduktet direkte kan bli benyttet til sitt påtenkte formål i en bioteknologiprosess siden arginin er fullt ut kompatibelt med de fleste cellekultur- eller renseprosesser.

De fysiologiske karakteristika for det sluttrensede produktet utført ifølge oppfinnelsen tillater dets direkte anvendelse i for eksempel cellekulturteknikker, proteinrensingsprosesser eller enhver annen prosess der trypsin benyttes. På grunn av den svært like virkningsmåten og spesifisiteten kan SGT bli benyttet som en erstatning for pattedyrtrypsin i nær sagt alle bioteknologiske applikasjoner. Når det er rensed slik at det har høy grad av uniformitet kan enzymet bli fullstendig hemmet ved hjelp av de velkjente trypsinhemmerene.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen blir det rensede SGT ifølge oppfinnelsen benyttet i en biologisk prosess slik som celledyrking, virusaktivering eller rensing. Det rensede SGT blir for eksempel benyttet til å løsgjøre eukaryote celler fra en matris, og eventuelt til ytterligere videredyrking av cellene, eller til inokulering i en fermenteringsinnretning. SGT ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet til formering av celler og/eller fremstilling av cellekulturbiomasse fra vertebratceller.

SGT ifølge oppfinnelsen kan også bli benyttet til fremstilling av en cellebiomasse eller til passering av overflateavhengige eukaryote celler på kulturskåler, Roux-flasker, roteringsflasker eller mikrobærerkultur. Kulturen kan være en ettlagskultur, en mikrobærerkultur, til suspendering av celler fra et lag, isolering og separering av celler fra vev eller fremstilling av primære cellekulturer. Vertebratcellen kan være enhver celle som er avledet fra vev fra et dyr, slik som et organ, fra primære celler eller celler fra en kontinuerlig cellelinje. Primære celler kan stamme fra apenyrer, hamsternyrer, hundenyre, ovarier eller andre organer som er kjent for å være nyttige til fremstilling av primære cellekulturer. Eksempler på celler fra en kontinuerlig cellelinje er VERO, CV-1, CHO, BHK, MDCK, MRC-5, MDBK, WI-38, og inkluderer transformerte, transfekterte og rekombinante celler.

Cellene blir foretrukket kultivert og dyrket i serumfritt medium. Mediet kan være et minimalt medium slik som DMEM eller DMEM-HAMs-F12 og andre minimale medier som er kjent på fagområdet, slik som beskrevet i Kistner et al. (1988, Vaccine 16:960-968). Aller helst blir cellene dyrket i et serum- og proteinfritt medium som beskrevet i WO 96/15213, WO 00/0300 eller WO 01/23527, hvorved nevnte minimale medium kan bli supplert med ekstrakter fra gjær eller soyapepton.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen blir det rensede SGT benyttet til fremstilling av virus eller virusantigen. Fremgangsmåtene omfatter trinnene med å tilveiebringe en cellekultur, ved å passere og videredyrke cellene ved å benytte rensed SGT ifølge oppfinnelsen, dyrke cellene til en biomasse og infisere cellene med et virus. Cellene blir foretrukket kultivert og dyrket i serumfritt eller serum- og proteinfritt medium.

Fremgangsmåtene som tilveiebringes av oppfinnelsen kombinerer en cellulær biomasse og virusfremstillingsprosess der alle trinnene blir utført ved betingelser som unngår enhver pattedyravledet kilde, slik som serum og protein i mediet. Under passering og videredyrking kan videre proteinmengden bli redusert på grunn av den høye spesifikke aktiviteten til SGT i cellekulturen. Fremgangsmåten reduserer derfor den totale proteinmengden av kontaminerende protein signifikant.

Eksempler på virus som kan bli benyttet i oppfinnelsen er de som tilhører gruppen av virusfamiliene orthomyxoviridae, paramyxoviridae, reoviridae, picornaviridae, flaviviridae, arenaviridae, herpesviridae, poxviridae, rhinoviridae og reoviridae og adenoviridae, helst de som er valgt fra gruppen med poliovirus, influensavirus, Ross-elvevirus, hepatitt-A-virus, Rubellavirus, Rotavirus, ksmavirus, meslingvirus, respiratorisk synkytisk virus, vacciniavirus og rekombinant vacciniavirus, herpes-simpleks-virus, TBEV, Japansk encefalittvirus, Vest-Nilvirus, Gul-feber-virus og kimere derav. Fremgangsmåter for å velge en hensiktsmessig vertscelle og et virus som er mottagelig for verten for formering av det ønskede viruset er velkjente. Celler kan bli valgt fra cellene som beskrevet ovenfor.

Ifølge en spesiell utførelsesform blir det rensede SGT benyttet til fremstilling av virus eller virusantigen der viruset blir aktivert med en protease. Slike virus er de som er valgt fra gruppen med paramyxoviridae, orthomyxoviridae og rotaviridae. Fremgangsmåtene

omfatter trinnene med å tilveiebringe en cellekultur, der cellene har blitt passert og videre-
dyrket ved å benytte rensed SGT ifølge oppfinnelsen, infisere cellene med virus som er valgt
fra gruppen med paramyxoviridae, orthomyxoviridae og rotaviridae, kontakte viruset med
rensed SGT for å aktivere viruset, formere viruset og høste det fremstilte viruset.

5 Til passering og videredyrking av cellene blir rensed SGT ifølge oppfinnelsen tilsatt i
en mengde på mellom omtrent 4 µg og omtrent 1000 µg, avhengig av cellekulturtypen,
volumet av kulturen eller mediet, og den spesifikke aktiviteten til det rensede SGT som
benyttes i dyrkingsprosessen. Mengden av protein som tilsettes for en statisk kultur kan
ligge i området fra omtrent 4 µg/150 cm² til omtrent 50 µg/150 cm², for en roteringsflaske i
10 området fra omtrent 50 µg/850 cm² til omtrent 100 µg/850 cm² og for en mikrobærerkultur
i området fra omtrent 1000 µg til omtrent 2000 µg/liter medium med et SGT-preparat som
har en spesifikk aktivitet på omtrent 26x10³ U/mg protein. Det ligger innefor evnene til en
erfaren fagmann å bestemme den minste mengden av protease/protein som er nødvendig
for betingelser for optimal passering og videredyrking. Fordelen med anvendelse av rensed
15 SGT ifølge oppfinnelsen er (i) å unngå protein fra en dyrekilde og (ii) å redusere protein-
mengde på grunn av den høye spesifikke aktiviteten til SGT mellom minst 5 ganger til minst
25 ganger sammenlignet med en konvensjonell cellekultur der trypsin fra en dyrekilde blir
benyttet.

Ifølge et aspekt av oppfinnelsen blir det rensede SGT ifølge oppfinnelsen benyttet til
20 fremstilling av en cellebiomasse som er dyrket i serum- og proteinfritt medium der nevnte
biomasse blir passert og videredyrket ved å benytte rensed SGT og der den totale protease-
proteinmengden blir redusert med minst 75 % sammenlignet med en cellekultur som blir
dyrket ved identiske betingelser ved å benytte pattedyravledet trypsin.

Til aktivering av viruset kan rensed SGT ifølge oppfinnelsen bli benyttet i en total
25 proteinmengde på omtrent 10 µg til omtrent 500 µg av kulturmedium (cm² eller cm³)
avhengig av den spesifikke aktiviteten til det rensede SGT som benyttes. Det ligger innefor
en erfaren fagmanns kjennskap å følge eksemplene slik de er beskrevet og tilpasse total
proteinmengde som er nødvendig av rensed SGT som har en gitt spesifikk aktivitet på minst
2x10⁴ U/mg for optimal virusaktivering og videre virusformering.

30 Ved å benytte rensed SGT-preparat til passering, videredyrking og eventuelt
virusaktivering kan proteinmengden som er avledet fra biomasseproduksjons- og virus-
formeringsprosess bli redusert med minst 75 %, helst med minst 90 %, sammenlignet med
en cellekultur som er fremskaffet ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter.

Ved hjelp av fremgangsmåten som er beskrevet blir et virus eller et virusantigen
35 fremskaffet der den totale proteinmengden av kontaminerende protein som er avledet fra
cellene og fra cellekulturmediet redusert med minst 75 % sammenlignet med et preparat
som er fremskaffet fra en konvensjonell cellekultur som har blitt dyrket under like beting-
elser men ved å benytte pattedyravledet trypsin.

Fremgangsmåten, slik som den er beskrevet ovenfor ved å benytte rensed SGT ifølge oppfinnelsen for å dyrke celler og eventuelt aktivere virus, kan videre omfatte trinnet med å rense viruset som blir fremstilt. På grunn av den lave mengden av kontaminerende protein (protein som ikke produkt/virus spesifikt) kan gjenværende kontaminerende protein bli fjernet ved hjelp av ytterligere rensing. Det rensede viruspreparatet som fremskaffes kan bli videre formulert i en immunogent preparat slik som i en profylaktisk eller terapeutisk vaksine.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen blir det rensede SGT benyttet i en rensesprosess. For et vidt spekter av rensesfremgangsmåter blir spesifikke protease slik som trypsin benyttet for å bryte ned kontaminerende proteiner, som deretter blir fjernet i ytterligere rensesrinn slik som filtrering, kromatografering eller ved sentrifugering. Det rensede SGT ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet effektivt i en rensesfremgangsmåte for fremstilling av rensed virus slik som HAV. Det ligger innenfor kunnskapen til en erfaren fagmann på området å bestemme den minimale mengden med rensed SGT ifølge oppfinnelsen som er nødvendig for å skape optimale betingelser.

Ifølge et annet aspekt blir rensed SGT ifølge oppfinnelsen benyttet til kontrollert prosessering av pro-proteiner slik at de får sin modne form, enten i væske eller immobilisert på en uløselig bærer som for eksempel beskrevet i US patentskrift 6,010,844.

Nå som oppfinnelsen er generelt beskrevet kan oppfinnelsen bli forstått med referanse til de påfølgende eksemplene.

Eksempler

Eksempel 1:

Rensing av *Streptomyces griseus*-trypsin fra pronase:

A. Ionebytterkromatografi.

30 g pronase (Boehringer Ingelheim) blir løst i buffer-A (0,02 pyridin, pH 5,0) til en sluttkonsentrasjon på 40 mg/ml pronase. 25 ml av løsningen blir utsatt for kationbytterkromatografi på CM-Sepharose-CI-6B (Pharmacia, balansert med buffer-A). Elueringen blir utført ved romtemperatur ved å benytte en lineær gradient av buffer-A (0,02 M pyridin) og buffer-B (0,75 M pyridin, pH 5,0) med 5 ganger kolonnevolumet.

Oppsamlede fraksjoner blir testet for hemmende egenskaper ved å blande prøver av fraksjonene med soyabønnehemmer i et 1:10-forhold (for eksempel 1 mg soyabønnehemmer / 100 µg protein) etterfulgt av en kromatografisk substratanalyse som benytter S2222. Resultatene blir uttrykt som Δ -absorbansenheter per minutt ($\Delta A/\text{min}$). Fraksjonen med den høyeste hemmende aktiviteten mot soyabønnehemmer blir videre analysert med SDS-PAGE og farget med Coomassie (fig. 1, spor 1).

Trypsinaktiviteten blir målt ved hjelp av kromogen analyse ved å benytte N-benzoyl-L-argininetyl ester (BAEE, i Tris-buffer pH 8,0, 20 mM CaCl₂, 25 °C) som substrat og Δ-absorbansenheter per minutt blir bestemt. Som en kontrollreferanse blir en løsning av trypsin fra svin (1 mg/ml) med en spesifikk aktivitet på 13×10^3 U/mg benyttet. Den spesifikke aktiviteten er definert som enhetene av trypsinenzymaktivitet per mg protein. Resultatene er summert i tabell 1.

Chymotrypsinaktiviteten blir målt ved hjelp av kromogen analyse ved å benytte 3-karboksymetoksypropionyl-L-arginyl-L-propyl-L-tyrosin-p-nitroanilinhydroklorid (S-2586, Chromogenix). Resultatene er uttrykt i Δ-absorbansenheter per minutt (ΔA/min).

Tabell 1

Rensing av pronase med ionebytterkromatografi

<i>Streptomyces griseus</i> -pronase	Pronase urensset	Renset fraksjon
Protein (g)	1	0,08
Spesifikk aktivitet U/mg	$1,6 \times 10^3$	$16,5 \times 10^3$
Gjenvinning av U i %	100	70
Stabilitet ved SDS-PAGE	i.b.	Ustabil, lavmolekylvektfragmentering
Hemming med soya-bønnehemmer (% hemming)	i.b.	90±0,1
Chymotrypsinaktivitet (ΔA/min)	450	38

* i.b. ikke bestemt.

Tabell 1 viser at fraksjonene som inneholder et protein med trypsinliknende aktivitet, slik som det er bestemt med hemmingstest med soyabønnehemmer, kan bli renset med ionebytterkromatografi med en spesifikk aktivitet som er omtrent 10 ganger høyere enn for pronase med en gjenvinning på omtrent 70 %. Proteinet er likevel ustabilt og viser ikke et enkelt bånd men ulike bånd i SDS-PAGE. Dette tyder på fragmentering og autokløyving av proteinet (fig. 1, spor 1).

B. Affinitetskromatografi på immobilisert benzamidin.

En Benzamidin-Sepharose-6B-fast-flow-kolonne (Pharmacia) balansert med buffer-A (50 mM Tris, 0,5 M NaCl pH 7,0) blir påsatt 40 ml av en pronaseløsning (75 mg/ml. Buffer-A). Eluering blir utført med buffer-B (50 mM Tris, 0,5 M NaCl pH 7,0, 10 mM benzamidinhydroklorid pH 7,0), buffer-C (0,5 M NaCl, 0,6 M arginin, pH 5,5) eller buffer-D (0,5 M NaCl, 1 M arginin, pH 5,5).

Fraksjonene som samles opp blir testet for hemmende egenskaper ved å benytte soyabønnehemmer i tillegg til trypsin- og chymotrypsinaktivitet som beskrevet i eksempel 1A. Den spesifikke aktiviteten blir bestemt som enheter av enzymaktivitet per mg protein.

5

Tabell 2

Rensing av pronase med affinitetskromatografi på immobilisert benzamidin og eluering med benzamidin

Affinitetskromatografi og eluering med benzamidin (buffer-B)		
<i>Streptomyces griseus</i> - pronase	Pronase urensset	Renset fraksjon
Protein (g)	3	0,13
Spesifikk aktivitet U/mg	$1,6 \times 10^3$	19×10^3
Gjenvinning av U i %	100	60
Stabilitet ved SDS-PAGE	stabil	Stabil
Hemming med soya- bønnehemmer (% hemming)	i.b.	$99,98 \pm 0,1$ %
Chymotrypsinaktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	i.b.	0,1

Resultatene som er summert i tabell 2 viser at 60 % av rensset trypsinliknende aktivitet fra pronase blir gjenvunnet med en høy spesifikk aktivitet ved hjelp av konkurrerende eluering med benzamidin. Den rensede trypsinliknende proteaseinneholdende fraksjonen blir likevel foretrukket ytterligere rensset og benzamidinet fjernet før det benyttes i prosesser som involverer cellekulturvekst eller fremstilling av biologiske midler til anvendelse på mennesker.

15

Tabell 3

Rensing av pronase med affinitetskromatografi på immobilisert benzamidin og eluering med 0,6 M arginin og 1 M arginin

Affinitetskromatografi og eluering med 0,6 M arginin (buffer-C)		
<i>Streptomyces griseus</i> - pronase	Pronase urensset	Renset fraksjon
Protein (g)	3	0,13
Spesifikk aktivitet U/mg	$1,6 \times 10^3$	26×10^3
Gjenvinning av U i %	i.b.	63
Stabilitet ved SDS-PAGE	stabil	stabil
Hemming med soya- bønnehemmer (% hemming)	i.b.	$99,89 \pm 0,1$ %

Chymotrypsinaktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	i.b.	<0,1
Affinitetskromatografi og eluering med 1 M arginin (buffer-D)		
<i>Streptomyces griseus</i> - pronase	Pronase urensset	Renset fraksjon
Protein (g)	3	0,13
Spesifikk aktivitet U/mg	$1,6 \times 10^3$	$146,5 \times 10^3$
Gjenvinning av U i %	i.b.	71
Stabilitet ved SDS-PAGE	stabil	stabil
Hemming med soya- bønnehemmer (% hemming)	i.b.	$99,99 \pm 0,2$ %
Chymotrypsinaktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	i.b.	<0,1
LAL (EU/1000U)	88	<4

Som resultatene i tabell 3 viser blir omtrent 63 % av den opprinnelige trypsin-liknende aktiviteten i pronase gjenvunnet når det benyttes en buffer som omfatter 0,6 M arginin, mens 71 % blir gjenvunnet med en buffer som omfatter 1 M arginin. Det rensede SGT som er eluert med arginin fra en benzamidinaffinitetsbærer har også en høyere spesifikk aktivitet sammenlignet med SGT som er fremskaffet ved ionebytterkromatografi eller eluering med benzamidin fra en benzamidinbærer. Videre blir et produkt med høyere renhet og spesifikk aktivitet fremskaffet når en buffer som omfatter økende molaritet med arginin blir benyttet.

Prøver av den urensede *S.griseus*-pronasen, strømmen gjennom affinitetskromatografikolonnen og det rensede SGT fra elueringen med 1 M arginin blir analysert med SDS-PAGE (fig. 2).

Prøver av fraksjonene som har den høyeste hemmende aktiviteten mot soyabønnehemmer blir analysert videre med Western-blot med anti-SGT-serum fra marsvin (fig. 3). Renheten av SGT blir bestemt ved hjelp av analytisk reversfase-HPLC der rensed SGT blir påsatt en reversfasekolonne (Nucleosil-300-5C18-150 x 2 mm) og eluert med en lineær gradient av acetonitril. Kromatogrammet av den revers-HPLC er vist i figur 4. Renhet blir uttrykt som forholdet mellom den største toppen og det totale topparealet. Reversfase-HPLC av rensed SGT viste en renhet på >95 %. Kromatogrammet viser en spiss topp som tilsvarer SGT. Online-HPLC-elektroskopi-ioniseringsmassespektroskopi (ESI-MS) blir benyttet for å bestemme molekylvekten til rensed SGT. Som molekylvekt tilsvarer den største toppen i kromatogrammet en molekylvekt på 23096,5 D som er i glimrende overensstemmelse med den teoretiske massen på 23099 D. Dataene blir ytterligere styrket av evalueringen av den korrekte N-terminalen (NH₂-V-V-G-G-T-R-A-A-Q-G-E-F-P-F-M-V-).

Den rensede trypsinliknende proteasen som er rensset med ett-trinns-affinitets-kromatografi på benzamidin og eluert med arginin er stabil i argininløsningen. Det rensede produktet vises som et enkelt bånd på SDS-PAGE og viser ingen signifikant fragmentering til lavmolekylærvektspolypeptider slik som det kan observeres i fig. 1 (spor 2), mens SGT som er rensset med ionebytterkromatografi er fragmentert i polypeptider med lavmolekylærvekt slik som det vises i fig 1 (spor 1).

Fremgangsmåten for rensing med affinitetskromatograf med konkurrerende eluering med arginin resulterer i rensset SGT som har en renhet på minst 95 %, som er intakt og stabil slik som det er vist med SDS/Western-blot og HPLC. I tillegg er den vesentlig fri for andre proteaseaktiviteter, spesielt chymotrypsin, endotoksiner og prosessrelaterte urenheter slik som benzamidin. På grunn av den høye konsentrasjonen av arginin i det rensede SGT-preparatet er SGT stabilt ved romtemperatur i minst 2 uker og viser ingen autokatalytisk aktivitet, produktstabilitet, økning av SGT-degraderingsprodukter eller tap av spesifikk aktivitet. Det stabiliserte SGT-preparatet i argininløsning på mellom 0,5 M til 1,2 M (pH mellom 2 og 10) er fysiologisk akseptabelt i de fleste biologiske prosesser og er klart til bruk i andre prosesser slik som aktivering av proteiner, virus eller i rensefremgangsmåter som beskrevet nedenfor.

Eksempel 2

Bestemmelse av enzymaktivitet for trypsin fra svin og rensset SGT benyttet til celledyrking av pattedyrceller.

Proteininnholdet og esteraseaktiviteten for hvert enzym blir målt ved å benytte BAEE (N-benzoyl-L-argininetyl ester) som et substrat for trypsin fra svin (renhetsgrad, type-IX, krystallisert, Sigma), pronase (renhetsgrad, Boehringer Ingelheim) og SGT fremskaffet ved affinitetskromatografi på benzamidin-Sepharose-6B og eluering med 0,6 M arginin ifølge eksempel 1B. Resultatene av dette og ytterligere eksperimenter er oppsummert i tabell 4.

Tabell 4

Spesifikk aktivitet for proteaser benyttet i VERO-kultureksperimenter

Protease	BAEE-aktivitet (Enheter/ml)	Protein (µg/ml)	BAEE-aktivitet / Protein (U/µg)
Trypsin fra svin	12 555	940	13,4
Urenset pronase	1 844	740	1,5
Renset SGT	8 564	330	26,0

Eksempel 3

Bestemmelse av total proteinmengde for videredyrket kultur av serum- og proteinfrie VERO-celler.

5

VERO-celler (nyreceller fra *Cercopithecus aethiops*) fremskaffet fra American Type Cell Culture Collection, Rockville, Maryland ved et passeringsnummer på 124 under betegnelsen ATCC CCL 81 blir dyrket i serum- og proteinfritt medium. Celler blir tilvendt å vokse i serumfritt eller i serum- og proteinfritt medium som beskrevet i Kistner et al. (1998, Vaccine 16:960-968, WO 96/15231 eller i US 6,100,061). Til vekst i serumfritt medium blir et basalt DMEM-HAMs-F12-medium supplert med uorganiske salter, aminosyrer, natriumbikarbonat (2g/l) og gjær- eller soyabønneekstrakt (0,1 til 10 g/l) benyttet. Cellene som benyttes er fremstilt uten bruk av noen dyreavledede mediumkomponenter.

En ampulle med celler som skal benyttes (WBC) av VERO-celler dyrket DMEM-medium blandet med HAMs-F12-næringsstoffblanding i et forhold på 1:1 blir resuspendert i serumfritt medium supplert med enten soyabønne- eller gjærekstrakt.

Ulike proteinkonsentrasjoner mellom 1 µg og 10 000 µg med trypsin fra svin (renhetsgrad, type-IX, krystallisert, Sigma), pronase (renhetsgrad, Boehringer Ingelheim) og rensset SGT med en spesifikk aktivitet som bestemt i eksempel 2 blir tilsatt til statiske kulturer i T-flasker, celler i roteringsflasker eller celler som er bundet til mikrobærere. Den totale proteinmengden av trypsin, pronase og rensset SGT som er nødvendig for fullstendig celleøsgjøring og påfølgende fastbundne (videredyrking) kulturer er vist i tabell 5.

Tabell 5 viser at når det benyttes rensset SGT så blir den totale proteinmengden av protease for celleøsgjøring og passering i en statisk kultur redusert til 4 %, i roteringsflasker til 17 % og i mikrobærerkultursystemet til 20 % sammenlignet med mengden som er nødvendig når trypsin benyttes.

Tabell 5

Sammenligning av total proteinmengde av protease som er nødvendig for fullstendig celleøsgjøring og videredyrking av VERO-celler

30

Cellekulturtype	Trypsin fra svin (µg)	Renset SGT (µg)	Reduksjon av proteinmengde
Statisk kultur (150 cm ²)	100	4	25x
Roteringsflaske (850 cm ²)	300	51	6x
Mikrobærerkultur (1 liter)	5 000	1 000	5x

Eksempel 4

Sammenligning av pattedyravledet trypsin, pronase og renset SGT på cellevekst

På småskalabasis blir cellefestings- og celledelingskarakteristika for VERO-celler dyrket i statiske kulturer (T-flasker) og i mikrobærerkulturer (Cytodex3, Pharmacia) sammenlignet. VERO-celler blir dyrket som beskrevet ovenfor i serum- og proteinfritt medium.

VERO-celler blir enten dyrket i T-flasker eller på mikrobærere (37 °C, CO₂-konsentrasjon 5-10 %). Videre dyrking blir utført som bestemt i eksempel 3 ved å benytte trypsin fra svin (renhetsgrad, type-IX, krystallisert, Sigma) og pronase (renhetsgrad, Boehringer Ingelheim) i T-flasker i en sluttmengde på 100 µg og i mikrobærerkultur på 5000 µg. Renset SGT med en spesifikk aktivitet på 2,6x10⁴ U/mg blir tilsatt til T-flaskekultur i en sluttmengde på 4 µg og i mikrobærerkultur på 1000 µg. Cellefesting og cellevekst blir målt ved hjelp av visuell inspeksjon og telling av celler som ikke er festet og blir uttrykt som celledelingsaktivitet. Tabell 6 viser celledelingsaktivitet uttrykt i % av total mengde av VERO-celler som enten er dyrket i T-flasker eller i mikrobærere.

Tabell 6

Effekt av trypsin, pronase og SGT på delingsaktivitet hos celler

Cellekulturtype	Protease (µg)		
	Trypsin 100 µg	Pronase 100 µg	Renset SGT 4 µg
Festing/vekst	90-100 %	90-95 %	90-100 %
Mikrobærerkultur	Trypsin 5000 µg	Pronase 5000 µg	Renset SGT 1000 µg
Festing/vekst	95-100 %	70 %	95-100 %

Som vist i tabell 6 tillot ikke ubehandlet pronase tilstrekkelig gjentatt overføring av VERO-celler dyrket i serumfritt medium, mens renset SGT er like effektivt som trypsin fra svin men med en signifikant redusert sluttproteinmengde.

Eksempel 5

Virusantigenproduksjon i VERO-celler ved å benytte renset SGT

5.1 *In vivo*-aktivering av influensavirus og virusproduksjon i roteringsflasker.

To VERO-kulturer blir dyrket i roteringsflasker til konfluens med en sluttverdi for celletetthet på omtrent 2x10⁸ per enhet. Kulturene blir infisert med influensaviruslinjen Nanchang A/H3N2 med en m.o.i. på 0,01. Trypsin fra svin (total proteinmengde: 500 µg) eller renset SGT (total proteinmengde: 50 µg) blir tilsatt for *in vivo*-aktivering av

influenzavirus, noe som tillater videre virusformering. Etter 48 timer blir hemagglutinerings-aktiviteten i kulturen bestemt.

Tabell 7

In vivo-aktivering av influensavirus med trypsin eller renset SGT

	Trypsin	Renset SGT
Mengde enzym	500 µg	50 µg
HAU / ml etter 48 timer	2560	2560

Dataene som er vist i tabell 7 viser at for effektiv *in vivo*-aktivering av influensavirus og virusformering er omtrent 1/10 av den totale proteinmengden av renset SGT nødvendig sammenlignet med pattedyravledet trypsin. Derfor tillot anvendelsen av renset SGT en 90 % reduksjon i total proteinmengde under *in vivo*-aktiveringstrinnet og gav samme influensavirusformering i VERO-celler sammenlignet med pattedyravledet trypsin.

5.2 Storskalaproduksjon av influensavirusantigen på celler dyrket i serum- og proteinfritt medium og som benytter SGT til virusaktivering.

En ampulle med celler som skal benyttes (WCG) med VERO-celler dyrket i DMEM-medium blandet med HAMS-F12-næringsstoffblanding i et forhold på 1:1 blir resuspendert i serumfritt medium supplert med enten soyabønne- eller gjærekstrakt. VERO-celler med et definert passeringsantall blir tint fra flytende nitrogen og passert i Roux- og roteringsflasker for å få produsert tilstrekkelig med celler til å kunne inokulere en bioreaktor på 1,5 liter. Cellene blir dyrket ved 37 °C i 6-8 dager. Kulturbetingelsene med oksygenmetting på 20 % +/- 10 % og pH 7,1 +/- 0,2 og omrøringsfart på 30-60 rpm blir kontrollert. Etter at endelig celletetthet på 1,5 (1,0-2,0)x10⁶ celler/ml er nådd blir celler løsgjort med renset SGT (1 mg/liter) og overført til en bioreaktor på 10 liter med en mikrobærerkonsentrasjon på 2,5 g/l (Cytodex III, Pharmacia). Celleantallet blir bestemt ved å trypsinere cellene og telle dem på en CASY-celleteller. Cellene blir dyrket ved konfluente kulturbetingelser for å nå en biomasse med en celletetthet på 1,0-1,5x10⁶ celler/ml.

Biomassen blir enten infisert med influensaviruslinjen Nanchang eller linjen Texas-36. Under virusformeringsprosessen og for ytterligere fremtidige lytiske infeksjonssykluser med influensavirus blir viruset aktivert ved tilsettingen av renset SGT i en konsentrasjon på 150 µg/liter. Tabell 8 oppsummerer influensavirusproduksjon som den er bestemt med HAU/ml etter 72 timer.

Tabell 8

Produksjon av ulike influensaviruslinjer etter aktivering med renset SGT

Influenسالinje	HAU/ml etter 72 timer
A/Nanchang 033/95	10 240
A/Texas-36	5 120

Ifølge resultatene som er vist i tabell 8 formerte VERO-celler som var passert og skalert opp med SGT effektivt og produserte influensavirus i storskala-bioreaktorer.

5 Eksempel 6

Renhet av influensavirusantigen fremskaffet ved formering på celler dyrket i serum- og proteinfritt medium og med anvendelse av SGT eller trypsin til virusaktivering.

To parallelle cellekulturer av VERO-celler blir dyrket til en biomasse som beskrevet i eksempel 5.2 der én blir passert og videredyrket med trypsin og én med rensset SGT i Roux- og roteringsflasker for å fremstille tilstrekkelig med celler for å kunne inokulere en bioreaktor på 1,5 liter. Etter å ha nådd endelig celletetthet på $1,5 (1,0-2,0) \times 10^6$ celler/ml blir cellene løsgjort ved hjelp av rensset SGT eller trypsin og overført til en bioreaktor på 10 liter med en mikrobærerkonsentrasjon på 2,5 g/l. Etter å ha nådd konfluente kulturbetingelser ved å oppnå en celletetthet på $1,0-1,5 \times 10^6$ celler/ml blir biomassen infisert med influensaviruslinjen Texas-36 (m.o.i. 0,01). For virusaktivering blir rensset SGT eller trypsin tilsatt til den respektive cellekulturen. På slutten av virusformeringsprosessen blir den klarede, høstede supernatanten inneholdende viruset rensset ved hjelp av ultrasentrifugering på en sukrosegradient. Renheten av antigenet som er rensset på sukrosegradienten blir bestemt ut fra forholdet mellom antigen og protein. Konsentrasjonen av hemagglutinin blir bestemt ved hjelp av enkel radial immunodiffusjon (SRD) som beskrevet av Wood et al. (1977, J. Biol. Stand. 5:237-247) og resultatene blir sammenlignet etter 72 timer for linje A/Texas-36. Resultatene er oppsummert i tabell 9.

Tabell 9

Sammenligning av renhet av influensaviruspreparater som er oppformert ved å benytte rensset SGT eller trypsin

Aktiverende protease	HAU/ml etter 72 timer	SRD (μ g/liter)	Forhold SRD/protein
Rensset SGT	5 120	1 245	0,32
Trypsin (fra svin)	10 240	1 125	0,13

Influensaviruspreparatet som er fremskaffet fra VERO-celler som er passert og oppskalert med rensset SGT tillater produksjonen av virusantigen med lavere protein-kontaminering. Disse resultatene viser at et viruspreparat med høyere renhet blir oppnådd

sammenlignet med å benytte trypsin etter et enkelt første rensetrinn. Videre har en økning i volumetrisk bioreaktorproduktivitet (uttrykt som total SRD per reaktordvolum) på 45 % blitt oppnådd.

5 Eksempel 7

Produksjon av Hepatitt-A-virus

7.1 Produksjon av HAV-antigen på celler som er dyrket på serum- og proteinfritt medium.

10 Full-lengde-cDNA fra genomet til den svekkede linjen HM175/7 klonet inn i det bakterielle plasmidet pHAV/7 (Cohen et al., 1987, J. Virol. 61:3035-3039) blir benyttet for å fremstille full-lengde-genomisk-RNA ved hjelp av *in vitro*-transkripsjon. Serum- og proteinfrie VERO-celler ved 34 °C blir transfektert med *in vitro*-transkribert HAV-RNA for å frem-
15 skaffe virus-stokkløsninger med HAV-HM175/7 som er frie for fremmede midler. VERO-cellebiomasse blir fremskaffet som beskrevet i eksempel 5.2.

For storskalaproduksjon av HAV-HM175/7-virus blir VERO-cellekulturer med en biomasse på 1×10^{11} celler sådd ut på en mikrobærer og oppformert ved 37 °C under serumfrie mediebetingelser i en fermenteringsinnretning på 100 liter. Temperaturen blir senket til 34 °C og i løpet av de påfølgende fermenteringssyklusene øker celleantallet 8 til 10
20 ganger. Cellene blir infisert i den siste fermenteringsinnretningen med HAV ved en m.o.i. på 0,01 til 0,1. Oppformering av de infiserte cellene ved 34 °C i opp til 350 dager kan bli utført med permanent tilføring av cellekulturmediet. Når virusantigen blir påvist i mediet blir den virusinnholdende supernatanten høstet og lagret ved 4 °C. Høstingen av cellekultur-supernatanten blir satt i gang ved dagene 34-45 etter infeksjon.

25

7.2 Rensing av HAV-innhøsting og karakterisering av rensset HAV.

HAV-innhøstingen av cellekultursupernatant ifølge eksempel 7.1 blir konsentrert 100 ganger ved hjelp av ultrafiltrering på et ProstaK-ultrafilter-200K etterfulgt av et diafiltreringstrinn (ProstaK 200K, Diafilter) med en buffer byttet ut til 50 mM Tris-buffer pH 8,0,
30 0,01 % Tween. Gjenværende rester av nukleinsyrer fra vertsceller som kan være til stede i preparatet blir fjernet ved å inkubere det som blir tilbakeholdt i diafiltreringstrinnet med Benzonase, som er en endonuklease fra *Serratia marcescens* og som er kommersielt tilgjengelig som Benzonase (Benzon Pharma A/S) i en konsentrasjon på 1000 U/l (løst i 1 mM MgCl_2), i 3 timer ved romtemperatur. Etter dette blir rensset *Streptomyces griseus*-
35 trypsin (SGT) ved en konsentrasjon på 0,5 til 5 U/ml tilsatt og det tilbakeholdte i diafiltreringsstrinnet blir ytterligere inkubert i 24 timer ved romtemperatur. Vertscellekontamineringene, d.v.s. nukleinsyrer og/eller proteiner blir fjernet ved hjelp av diafiltrering på en 100K-membran med 20 mM PBS pH 7,4 som buffer.

Prøver inneholdende minst 1000 ELISA-enheter/ml med HAV-antigen blir tatt under hvert filtreringstrinn, utsatt for SDS-PAGE og sølvfarget for å visualisere total proteinmengde eller analysert med Western-blot-analyse for å bestemme HAV-spesifikke antigener. HAV-spesifikke antigener blir identifisert med Western-blot-analyse ved å benytte antiserum som er spesifikt for HAV-kapsidproteiner. Det kan bli vist at HAV-forløperproteiner blir fjernet i løpet av renseprosessen. HAV-spesifikke polypeptider påvist i utgangsmaterialet av cellekultursupernatanten er ikke til stede i det tilbakeholdte etter diafiltreringsstrinnet etter behandling med rensed SGT mens de HAV-spesifikke kapsidproteinene VP1, VP2 og VP3 ikke blir påvirket av proteasebehandling. Analysen av ulike intermediære stoffer ved hjelp av sølvfarging og Western-blot viser klart effektiviteten til proteasebehandlingsrenseprosedyren ved å benytte rensed SGT.

Western-blot-analyse som benytter et antiserum utviklet mot VERO-celleproteiner viste at et bredt spekter av stort sett høymolekylærvækt-VERO-proteiner er påvisbare i utgangsmaterialet og i mellomrensetrinn. I det sluttrensede produktet er likevel kun små kontaminerende VERO-celleproteiner påvisbare. Dette viser at behandlingen det godt rensede SGT effektivt degraderer kontaminerende VERO-celleproteiner og HAV-forløperproteiner under HAV-produksjons- og HAV-renseprosesser.

Eksempel 8

Aktivering av protrombin til trombin med immobilisert rensed SGT og gjenvinning av trombinet med affinitetskromatografi

Rensed SGT (100 mg protein/g våt gel) blir koplet til agarosegel (5000 BAEE U SGT/ml gel). En glasskolonne blir fylt med 0,1 ml immobilisert SGT-agarose og rekombinant protrombin blir utsatt for det immobiliserte SGT under identiske betingelser som beskrevet i US 6,010,844. Trombin blir isolert og klargjort i henhold til fremgangsmåten beskrevet i US 6,010,844.

P a t e n t k r a v

1. Renset preparat av *Streptomyces griseus*-trypsin (SGT) som har en renhet på minst 95 % med hensyn til kontaminering/forurensning med andre proteaser og videre omfatter
5 arginin i en konsentrasjon på 0,5 M til 1,2 M
k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet er fremskaffet ved hjelp av en fremgangsmåte som omfatter å kontakte Pronase proteasen med en immobilisert affinitetsenhet som omfatter benzamidin, og selektivt eluere SGT'et fra den immobiliserte affinitetsenheten med en elueringsløsning som omfatter arginin i en konsentrasjon på 0,5 M til 1,2 M, hvor det
10 rensede preparatet av SGT har en spesifikk aktivitet på minst omtrent 25×10^3 U/mg protein, hvor den spesifikke aktiviteten er målt ved anvendelse av N-benzoyl-L-argininetyl ester (BAEE) i Tris-buffer pH 8.0, 20 mM CaCl_2 ved 25 °C som et substrat.
2. Anvendelse av et preparat ifølge krav 1, i en celledyrkings-, en virusaktiverings-
15 eller renseprosess.
3. Anvendelse av et preparat ifølge krav 1, i en renseprosess for et virus eller et virus-antigen.
- 20 4. Anvendelse av et preparat ifølge krav 1, for fremstilling av virus for vaksineproduksjon.
5. Anvendelse av et preparat ifølge krav 1, for aktivering av proteiner fra pro-
25 proteiner.

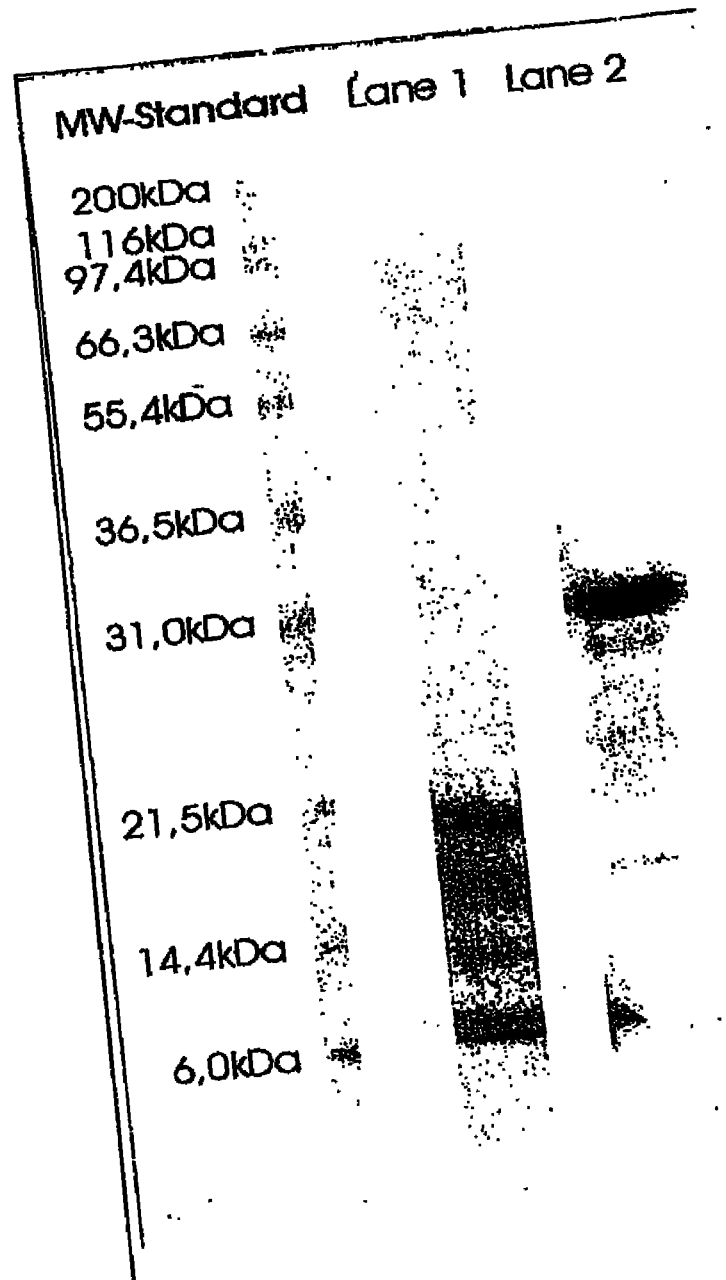


Fig 1

2/4

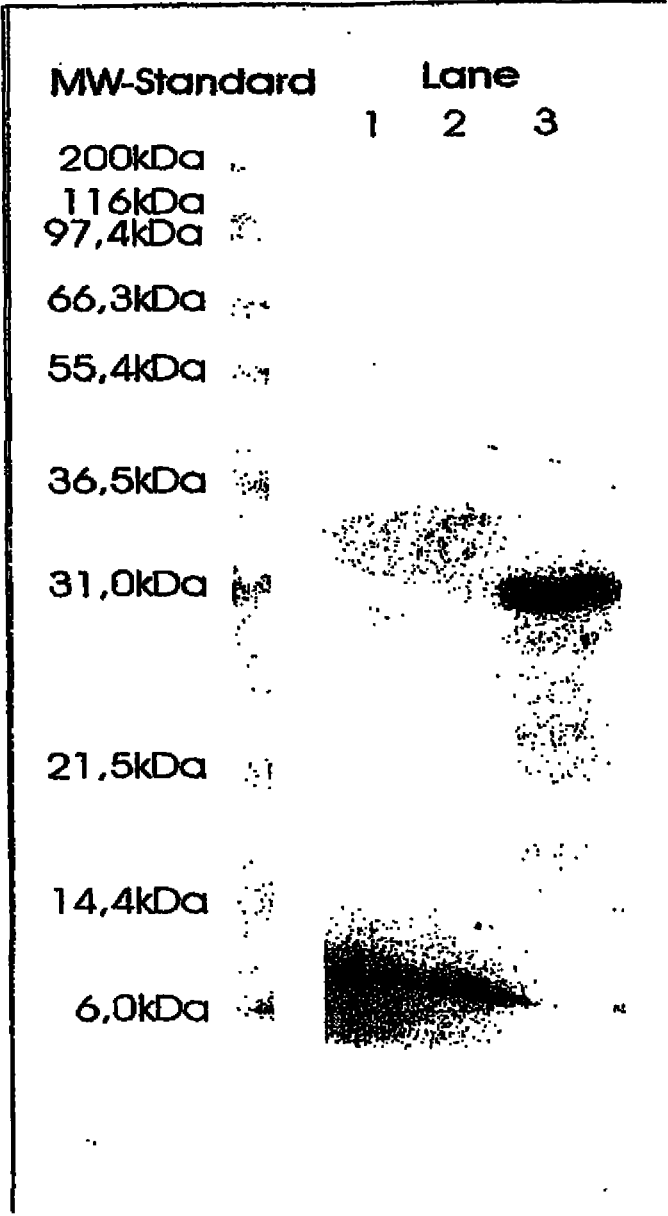


Fig 2

3/4

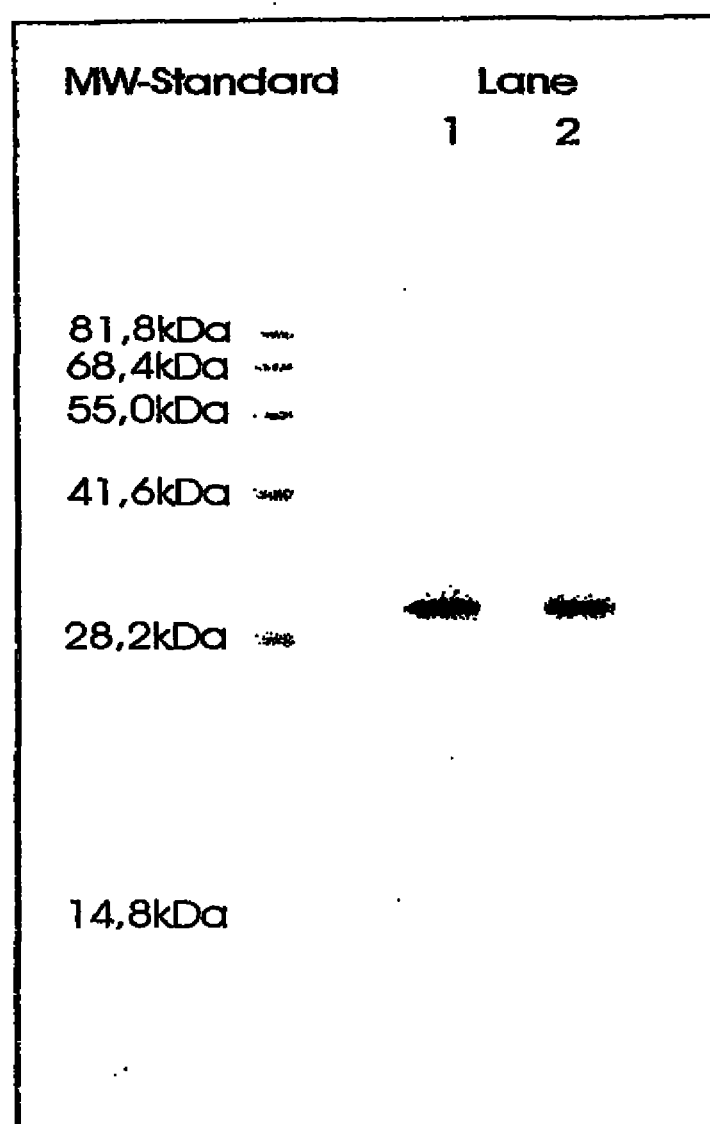


Fig. 3

4/4

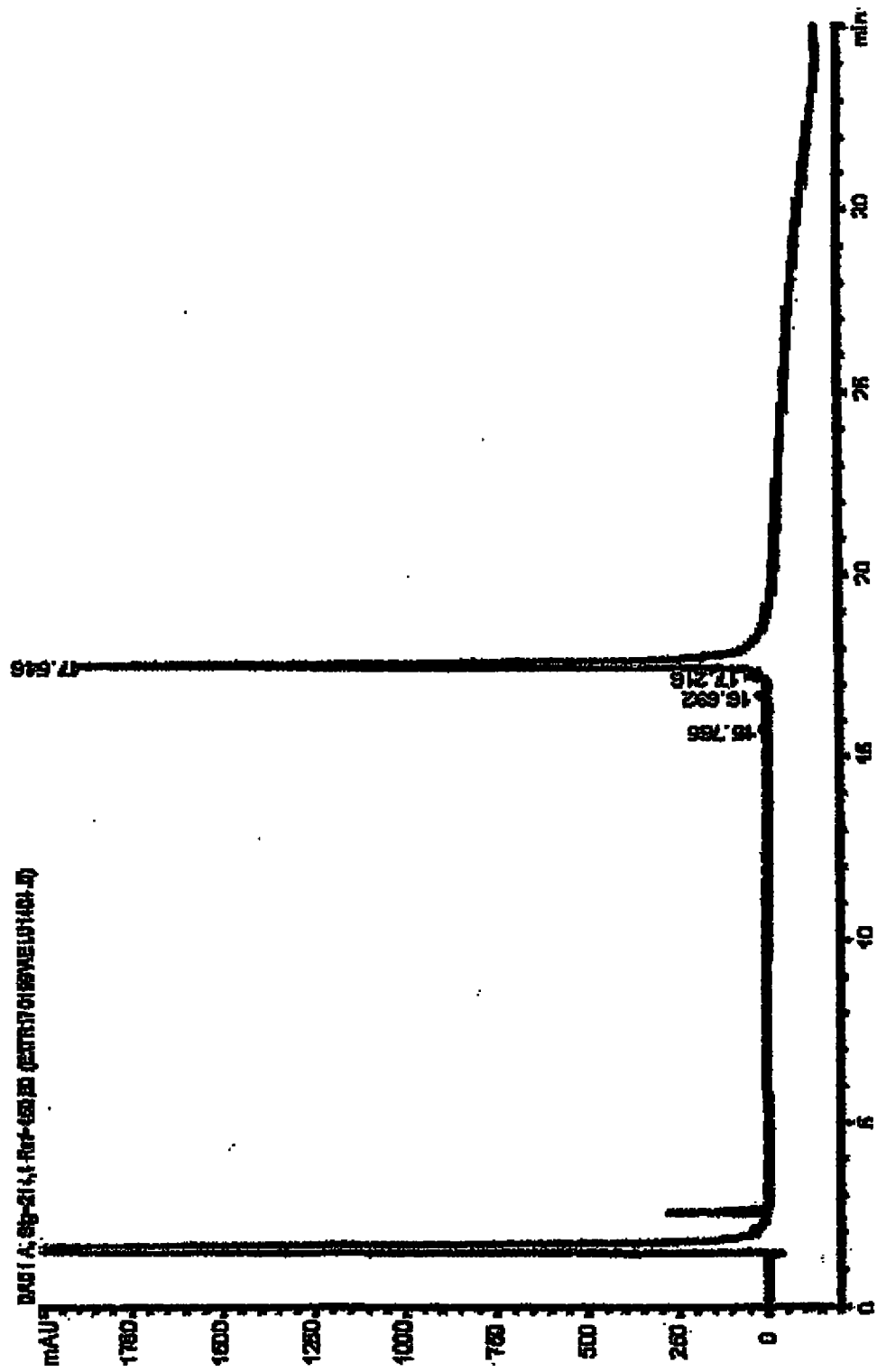


Fig 4