



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **176797**

(13) **B**

(51) Int Cl⁶ C 07 K 1/30, 14/55, C 12 P 21/02

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	885678	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	31.03.88, PCT/US88/01043
(22) Inng. dag	21.12.88	(85) Videreføringsdag	21.12.88
(24) Løpedag	31.03.88	(30) Prioritet	11.05.87, US, 48408
(41) Alm. tilgj.	21.12.88		25.03.88, US, 167144
(44) Utlegningsdato	20.02.95		

(71) Patentsøker Cetus Corporation, 1400 Fifty-Third Street, Emeryville, CA 94608, US
(72) Oppfinner Sidney N. Wolfe, El Cerrito, CA, US
Glenn Dorin, San Rafael, CA, US
John T. Davis, Berkeley, CA, US
Amy Lim, San Francisco, CA, US
Flint Smith, Oakland, CA, US
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) Benevnelse **Frengangsmåte for utvinning av rensset, renaturert rekombinant interleukin-2 fra mikroorganismer**

(56) Anførte publikasjoner EP patentsøknad, publ.nr 206826

(57) Sammendrag

Frengangsmåte for utvinning av rekombinant IL-2 med høy renhet fra transformerte mikroorganismer hvori cellene blir ødelagt; urent rekombinant IL-2 blir isolert i form av refraktile legemer fra disruptatet; urent IL-2 blir løst opp og denatureert med minst 6 M guanidinhydroklorid inneholdende et reduksjonsmiddel; redusert IL-2 blir presipitert og påny løst opp; redusert oppløst IL-2 deri blir oksydert i en kontrollert oksydasjon, hvori konsentrasjonen av guanidinhydroklorid blir opprettholdt på minst 6 M; oksydert IL-2 blir påny foldet ved redusering av guanidinhydroklorid-konsentrasjonen i oppløsningen; og oksydert, påny foldet IL-2 blir videre rensset ved ione-byttekromatografi eller hydrofob interaksjonkromatografi og ione-byttekromatografi.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for utvinning av rensset, renaturert rekombinant interleukin-2 (IL-2) fra transformerte mikroorganismer hvori de blir produsert.

5 IL-2, et lymfokin som blir produsert av normale perifere blodlymfocytter og som induserer proliferasjon av antigen eller mitogen stimulerte T-celler etter eksponering til plantelektiner, antigener, eller andre stimuli, ble først beskrevet av Morgan, D.A., et al, Science (1976) 193:1007-
10 1008. Deretter ble det betegnet T-celle vekstfaktor på grunn av dets evne til å indusere proliferasjon av stimulerte T-lymfocytter og det er nå blitt oppdaget at i tillegg til vekstfaktoregenskapene så modulerer det en mengde funksjoner til immunsystemceller in vitro og in vivo og navnet er blitt
15 skiftet til IL-2. IL-2 er en av flere lymfocytt-produserte messenger (beskjed) -regulatoriske molekyler som tilveiebringer immunocytinteraksjoner og funksjoner.

IL-2 ble opprinnelig fremstilt ved kultivering av humane
20 perifere blodlymfocytter (PBL) eller andre IL-2-produserende cellelinjer. Se, blant annet, US-PS 4,401,756. Rekombinant DNA-teknologi har tilveiebragt et alternativ til PBLer og cellelinjer for produksjon av IL-2. Taniguchi, T., et al, Nature (1983) 302:305-310 og Devos, R., Nucleic Acids
25 Research (1983) 11:4307-4323 har rapportert kloning av det humane IL-2-genet og uttrykking av dette i mikroorganismer.

Nativt humant IL-2 er en antigen-uspesifikk, genetisk ubeskyttet oppløselig faktor produsert av erytrocytt rosett-
30 positive T-celler stimulert med antigener, mitogener eller alloantigener. Det er et protein med en rapportert molekylvekt i et omtrentlig område på 13.000 til 17.000 daltons (S. Gillis og J. Watson, J. Exp. Med (1980) 159:1709) og et isoelektrisk punkt i et omtrentlig område på pH 6-8,5.
35 Humant IL-2 har et antall in vitro og in vivo effekter innbefattende forsterking av de proliferative responsene til humane perifere blodmononukleære celler eller murine ty-mo-

cytter, forsterking av immunresponsen i mennesker og i dyr mot bakteriell, parasittisk, sopp, protozo og virale infeksjoner, og understøtting av veksten av kontinuerlige T-cellelinjer.

5

Humant IL-2 er blitt tilveiebragt fra genetisk omkonstruert E. coli som et uglykosylert protein med biologiske aktiviteter som var ekvivalente til nativt, glykosylert IL-2. (Taniguchi et al, Nature (1983) 11:4307-4323, Rosenberg et al, Science (1984) 223:1412-1415, Wang et al, Science (1984) 224:1431-1433; og Doyle et al, J Biol Resp Modifiers (1985) 4:96-109). Rosenberg og hans medarbeidere har vist at systemisk administrasjon av rekombinant IL-2 i høye doser forårsaker regresjon av etablerte metastatiske svulster i mus (Rosenberg et al, J. Exp. Med (1985) 161:1169-1188); og sammen med lymfokin-aktiverte drepende (killer) celler (Rosenberg et al, New Eng J Med (1985) 313:1485-1492) og lymfocytter med svulst-infiltrasjon (Rosenberg et al, Science (1986) 233:1318-1321), i mennesker.

20

U.S. patentnummer 4,518,584 beskriver muteiner (analoger) av IL-2 hvori cysteinet som vanligvis oppstår i posisjon 125 i vill-type eller det native molekylet er blitt erstattet med en nøytral aminosyre, såsom serin eller alanin. Europa patent (EP) publikasjon 200,280 beskriver muteiner av IL-2 hvori metionin i posisjon 104 er blitt erstattet med en konservativ aminosyre.

25

Mikrobielt produsert IL-2 blir ikke glykosylert og blir hovedsakelig produsert i en denaturert tilstand. Den er stort sett uopløselig og, når uttrykt i høye nivåer, presipiteres den intracellulært i form av "refraktile" eller "innleirende" legemer som fremkommer som lyse flekker som er synlige innenfor celleområdet under et fase kontrastmikroskop ved forstørrelser ned til 1000 ganger. Problemet som er fremsatt ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter hvordan man effektivt kan utvinne IL-2 fra cellen i en rensset, cystein-

35

brodannet, renatureert form som er akseptabel for klinisk anvendelse.

5 De fra før tilgjengelige metodene for utvinning av mikrobielt produsert IL-2 er beskrevet nedenfor.

10 US-PS 4,569,790 beskriver en fremgangsmåte for utvinning av rekombinant IL-2 fra en IL-2-produserende mikroorganisme hvori cellen blir ødelagt, og disruptatet blir ekstrahert med en vannholdig oppløsning av et kaotropisk middel, såsom urea, IL-2 blir oppløst med et overflateaktivt middel, f.eks. natriumdodecylsulfat (SDS), og IL-2 blir separert i nærvær av et reduserende middel.

15 US-PS 4,530,787 og 4,572,978 beskriver fremgangsmåter for rensing av rekombinant IL-2 fra mikroorganismer hvori delvis rensed IL-2 blir selektivt oksydert under kontrollerte betingelser til dets oksyderte (cystin) form. Det første patentet anvender o-jodosobenzosyre som et oksyderingsmiddel og det siste anvender Cu^{+2} kationet som en fremmer for oksydasjon.

25 Europa patentpublikasjon 206,828 publisert 30. desember 1986, og med tittelen "Process for Recovering Refractile Bodies Containing Heterologous Proteins from Microbial Hosts" beskriver fremgangsmåter for utvinning og rensing av refraktile legemer av IL-2 fra E. coli. For å isolere det refraktile stoffet, innbefatter fremgangsmåten først ødelegg-
30 ging av celleveggen og membranen til vertscellen, fjerning av mere enn 99 vekt-% av saltene fra disruptatet, deretter påny ødelegge det avsaltede disruptatet, tilsetning av et stoff til disruptatet for å danne en tetthetsgradient eller viskositetsgradient i væsken som er i disruptatet, og separering av det refraktile stoffet fra celledebriet ved
35 sentrifugering ved høy hastighet. IL-2 blir deretter oppløst med et oppløsningsmiddel såsom SDS, kromatografert for å fjerne forurensninger med høy molekylvekt, oksydert, og

renset ved en kombinasjon av HPLC, ultrafiltrering og gelfiltrering.

5 Et sammendrag med tittel "Purification and Renaturation of Recombinant Interleukin-2" presentert ved 6th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides i Baden-Baden, Vest-Tyskland i oktober 1986 beskriver en fremgangsmåte hvori rekombinant IL-2 blir løst opp fra innleirings-legemer med 6 M guanidinhydroklorid/10 mM ditiotreitol (DTT) og renset i en redusert, denaturert form ved FPLC gelgjennomtrengning. Oppløsningen fra FPLC gelgjennomtrengningen blir fortynnet for å tilveiebringe renaturering og autooksydasjon. I dette henseendet beskriver US patentene numrene 4,511,502; 4,511,503; 4,512,922 og 10 4,518,526; og EP publikasjon 114,506 en lignende fremgangsmåte for rensing av heterologe proteiner generelt fra refraktile legemer. I slike fremgangsmåter, blir oksyderingen og renatureringen av IL-2 utført i et enkelt trinn. Men fordi karakterene for oppløselighet er forskjellig mellom den 15 reduserte og oksyderte formen av IL-2, er det vanskelig å oppnå høyt utbytte av renatureert oksydert IL-2 i en slik fremgangsmåte.

EP publikasjon 145,390 beskriver en fremgangsmåte for 25 utvinning av rIL-2 fra E. coli hvori cellene blir suspendert i 7 M guanadinhydroklorid, de faste stoffene blir fjernet ved sentrifugering, rIL-2 inneholdende supernatanten blir dialysert for å fjerne guanidinhydroklorid og dialyzatet blir renset ved anion-byttekromatografi, gelfiltrering og RP-HPLC.

30 Foreliggende oppfinnelse er rettet mot en forbedret rekombinant IL-2 rensingsprosess hvori oksydering og renaturering blir utført i distinkte trinn.

35 Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte med høyt utbytte hvori IL-2 blir separert fra et cellulært disruptat i form av et refraktilt legeme, løst opp med et kaotropisk

middel og oksydert og renaturert i separate trinn etterfulgt av rensing til et klinisk akseptabelt nivå.

5 Mere spesifikt vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for utvinning av rensset oppløselig rekombinant IL-2 fra en transformert mikroorganisme inneholdende IL-2 innbefattende:

(a) ødelegging av cellemembranen og celleveggen til mikro-
organismen;

10

(b) separering av det vannoppløselige IL-2-inneholdende materialet fra disruptatet;

15

(c) blanding av det uoppløselige IL-2-inneholdende materiale fra trinn (b) ved en pH på omtrent 7 til omtrent 9 med en vannholdig oppløsning av et guanidinsalt på minst 6M og et reduksjonsmiddel hvorved IL-2 i det uoppløselige materialet blir løst opp og denatureert;

20

(d) presipitat av IL-2 fra den IL-2-inneholdende oppløsningen og utvinning av presipitatet;

(e) oppløsning av IL-2-presipitatet;

25

(f) oksydering av IL-2 i oppløsningen, mens konsentrasjonen av det kaotrofiske middelet blir opprettholdt ved en sterk denaturerende konsentrasjon hvorved den naturlige disulfidbroen i IL-2 dannes;

30

(g) etter at oksydasjonen i trinn (f) er fullført, reduseres guanidinkonsentrasjonen i oppløsningen slik at oksydert IL-2 blir renaturert og et presipitat blir dannet;

35

(h) separering av presipitatet fra trinn (g) fra oppløsningen for å tilveiebringe en supernatant;

(i) renser oksydert IL-2 i supernatanten ved (1) revers-fase høy prestasjon-væskekromatografi etterfulgt av at man oppløser de sammenblandede fraksjonene i en oppløsning av kaotropisk middel og fjerner det kaotropiske middelet fra oppløsningen, eller (2) hydrofob interaksjonskromatografi kombinert med ionebytte-kromatografi, eller (3) ionebytte-kromatografi; og

(j) utvinner et rensset oksydert, oppløselig heterolog human IL-2-sammensetning med et IL-2-innhold på minst omtrent 95% som bestemmes ifølge redusert natriumdodecylsulfatpolyakrylamidgelelektroforese-analyse, en oppløselighet i fosfatbufret saltvann på minst 3 mg IL-2 per ml, en spesifikk aktivitet på minst omtrent 1×10^7 enheter/mg som bestemmes ifølge HT-2 celleproliferasjonsanalyse, og et endotoksininnhold på mindre enn omtrent 0,1 nanogram pr. mg IL-2.

Figur 1 er et arbeidsdiagram av den foretrukne fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Figur 2 er en grafisk fremstilling av resultatene av immunoanalysen beskrevet i eksempel 1, nedenfor. De lukkede sirkelene representerer SDS-prosess IL-2 og de lukkede firkantene representerer guanidin-prosess IL-2, begge er beskrevet i eksempelet.

Fremgangsmåter for utføring av oppfinnelsen

A. Definisjoner

Betegnelsen "IL-2" refererer til rekombinant interleukin-2 eller interleukin-2-lignende polypeptider produsert av en transformert mikroorganisme og hvori aminosyresekvensen er den samme som eller lignende eller vesentlig homolog med uglykosylert og/eller glykosylert nativt interleukin-2. Eksempler på slike rekombinante IL-2er er de som er beskrevet i Europa publisert patentsøknader 91,539, 88,195, og 109,748, og likeledes de som er beskrevet i U.S. patentnr. 4,518,584, patentanmeldt, tilegnet U.S. serienr. 893,186, inngitt 5. august 1986, EP publikasjon 200,280, og bovint IL-2 som

beskrevet av Cerretti et al, Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83:3223-3227. Beskrivelsene av alle disse referansene er inkorporert heri ved referanse.

5 Rekombinante IL-2er som er spesielt foretrukket er de biologisk aktive muteinene (analoger) av humant IL-2 hvori aminosyreresidene som ikke er essensielle for biologisk aktivitet med hensikt er blitt deletert i noen tilfeller eller erstattet med en konservativ aminosyre, som angitt
10 nedenfor. Foretrukne rekombinante IL-2er innbefatter de hvori cysteinresidiet i posisjon 125 er erstattet med en annen aminosyre, fortrinnsvis nøytral eller konservativ, for å eliminere seter for intermolekylær kryssbinding eller uriktig intramolekylær disulfid og, eventuelt, er det N-terminale
15 alaninresidiet til den native motparten fjernet. Som anvendt heri, innbefatter slike nøytrale eller konservative aminosyrer glycin, serin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin og metionin. Foretrukne rekombinante IL-2-muteiner i formuleringen ifølge foreliggende oppfinnelse er de hvori (1)
20 cysteinresidiet i aminosyreposisjon 125 til den native motparten er erstattet med et serinresidie (betegnet IL-2_{ser125}) eller alaninresidiet (betegnet IL-2_{ala125}); eller (2) det opprinnelige alaninresidiet er eliminert og cystein i posisjon 125 er erstattet med serin (betegnet des-alanyl-IL-
25 2_{ser125}).

Andre IL-2er som er spesielt foretrukket heri er de biologisk aktive muteinene beskrevet i Europa patentpublikasjon 200,280 hvori oksydasjons-mottagelige metioninresidier er erstattet
30 med en nøytral eller konservativ aminosyre; et foretrukket mutein innbefatter erstatning av metionin i posisjon 104 med en konservativ aminosyre såsom alanin.

EP 200,280 beskriver også amino-terminale delesjoner av IL-2
35 hvori en eller flere av de første seks aminosyrene er deletert. Foretrukne oksydasjons-resistente muteiner innbefatter ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2, ala₁₀₄IL-2,

ala₁₀₄ala₁₂₅IL-2, val₁₀₄IL-2, val₁₀₄ala₁₂₅IL-2,
 val₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-
 ala₁ala₁₀₄IL-2, des-ala₁ala₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-
 ala₁val₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-ala₁val₁₀₄IL-2, des-
 5 ala₁val₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2,
 des-ala₁-des-pro₂ala₁₀₄IL-2, des-ala₁des-
 pro₂ala₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂val₁₀₄ser₁₂₅IL-2,
 des-ala₁des-pro₂-val₁₀₄IL-2, des-ala₁des-
 pro₂val₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 10 thr₃ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 thr₃ala₁₀₄IL-2, des-ala₁des-pro₂-des-thr₃ala₁₀₄ala₁₂₅IL-2,
 des-ala₁des-pro₂des-thr₃-val₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-
 ala₁des-pro₂des-thr₃val₁₀₄IL-2, des-ala₁des-
 pro₂des-thr₃val₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 15 thr₃des-ser₄ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 thr₃des-ser₄ala₁₀₄IL-2, des-ala₁des-pro₂des-thr₃des-
 ser₄ala₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-thr₃des-
 ser₄val₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-thr₃des-
 ser₄val₁₀₄IL-2, des-ala₁des-pro₂des-thr₃des-
 20 ser₄val₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-thr₃des-
 ser₄des-ser₅ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 thr₃des-ser₄des-ser₅ala₁₀₄IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 thr₃des-ser₄des-ser₅ala₁₀₄ala₁₂₅-IL-2, des-ala₁des-
 pro₂des-thr₃des-ser₄des-ser₅val₁₀₄-ser₁₂₅IL-2, des-
 25 ala₁des-pro₂des-thr₃des-ser₄des-ser₅-val₁₀₄IL-2, des-
 ala₁des-pro₂des-thr₃des-ser₄des-ser₅-val₁₀₄-ala₁₂₅IL-2,
 des-ala₁des-pro₂des-thr₃des-ser₄-des-ser₅des-
 ser₆ala₁₀₄ala₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂-des-thr₃des-
 ser₄des-ser₅des-ser₆ala₁₀₄IL-2, des-ala₁des-pro₂des-
 30 thr₃des-ser₄des-ser₅des-ser₆ala₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-
 ala₁des-pro₂des-thr₃des-ser₄des-ser₅-des-
 ser₆val₁₀₄ser₁₂₅IL-2, des-ala₁des-pro₂des-thr₃-des-
 ser₄des-ser₅des-ser₆val₁₀₄IL-2, eller des-ala₁des-pro₂des-
 thr₃des-ser₄des-ser₅des-ser₆val₁₀₄-ala₁₂₅IL-2.

35

Andre aminoterminaler delesjoner i IL-2 er beskrevet i
 Chemical Abstracts (1987) 106:(21):170236f, et sammendrag fra

japansk patentpublikasjon nr. 61/225199, publisert 6. oktober 1986, hvori et hvilket som helst av de første 15 aminosyrene i IL-2 er deletert. PCT 87/04714, publisert 13. august 1987 beskriver delesjoner eller erstatninger av en eller flere av aminosyreresidene i posisjonene 2 til 11 og/eller 128 til 133 fra den amino-terminale alanin i IL-2.

Den nøyaktige kjemiske strukturen til IL-2-proteinet avhenger av et antall faktorer. Da ioniserbare amino- og karboksylgrupper er tilstede i molekylet, kan et bestemt rekombinant IL-2-protein bli tilveiebragt som et surt eller basisk salt, eller i nøytral form. Alle slike preparater som har beholdt aktiviteten når de blir plassert i egnede omgivende betingelser er innbefattet i definisjonen av IL-2-proteinene heri. Den primære aminosyresekvensen til proteinet kan bli forlenget ved derivatisering ved anvendelse av sukkerbestanddelene (glykosylering) eller ved anvendelse av andre tilleggs-molekyler, såsom lipider, fosfat, acetylgrupper og lignende, vanligvis ved konjugasjon med sakkarider. Visse aspekter av slik forlenging blir tilveiebragt gjennom post-translasjonsprosesseringssystemer i den produserende verten; andre slike modifikasjoner kan bli innført in vitro. Slike modifikasjoner er uansett innbefattet i definisjonen av IL-2-proteinet heri forutsatt at aktiviteten til proteinet, som definert ovenfor, ikke er ødelagt. Det er selvfølgelig ventet at slike modifikasjoner kan kvantitativt eller kvalitativt påvirke den biologiske aktiviteten, enten ved forsterking eller reduksjon av aktiviteten til proteinet i de forskjellige analysene.

Betegnelsen "transformert" til beskrivelse av vertsmikroorganismecellekulturer betegner en mikroorganisme som er blitt genetisk omkonstruert til å produsere et IL-2 polypeptid som har evnen til å ha aktiviteten til nativt IL-2. Bakterier er foretrukne mikroorganismer for produksjon av IL-2-protein. E. coli er spesielt foretrukket.

Betegnelsen "kaotrofisk" middel betegner en forbindelse eller forbindelser som, i vannholdig oppløsning og i en egnet konsentrasjon, har evnen til denaturering av rekombinant IL-2. Korrelativt refererer betegnelsen "sterkt denaturerende konsentrasjon" til en oppløsning av et kaotrofisk middel som effektivt "folder-opp" eller denaturerer rekombinant IL-2. Guanidinsalter (f.eks. hydroklorid) og alkalimetalltiocyanat (f.eks. natriumtiocyanat) ved konsentrasjoner i området på omtrent 4 til 9 M, fortrinnsvis 6-9 M, er eksempler på kaotrofisk middelopløsninger som vil løse opp og denaturere rekombinant IL-2.

Cellevekst

IL-2-produserende transformerte mikroorganismer blir dyrket i et egnet vekstmedium, vanligvis til en optisk tetthet (OD) på minst omtrent 30 til 680 nm, og fortrinnsvis mellom omtrent 20 og 40 ved 680 nm. Sammensetningen av vekstmediumet avhenger av den bestemte mikroorganismen som er involvert. Mediumet er et vannholdig medium inneholdende forbindelser som oppfyller ernæringskravene til mikroorganismer. Vekstmediumet inneholder vanligvis fordøyelige kilder av karbon og nitrogen, energikilder, magnesium, kalium og natriumioner, og eventuelt aminosyrer og purin og pyrimidinbaser. (Se Review of Medical Biology, Lange Medical Publications, 14th Ed. s. 80-85 (1980)). I ekspresjonsvektorer som innbefatter trp-promoterer, er tryptofankonsentrasjonen i mediumet nøyaktig kontrollert for å bli begrensende på det tidspunktet hvor proteinekspresjon er ønskelig. Vekstmedia for E. coli er velkjent innenfor fagområdet.

Etter at cellene er høstet fra kulturen, kan de bli konsentrert, hvis nødvendig, til omtrent 20 til 150 mg/ml, fortrinnsvis 80 til 100 mg/ml (OD 40 til 300, fortrinnsvis 160 til 200 ved 680 nm) ved kryss-strømningsfiltrering, sentrifugering, eller andre konvensjonelle metoder.

Celleoppbryting

Etter konsentrering av høstet kultur blir cellemembraner og cellevegger til mikroorganismene brutt opp. En forbindelse som ikke er giftig for mennesker, såsom 1-oktanol, i en mengde på omtrent 1 vekt-% av totale komponenter, blir satt til de oppbrutte cellene for å forsikre at det ikke er noen levedyktige rekombinante organismer igjen. Konvensjonelle celleoppbrytingsteknikker, såsom homogenisering, sonikering, eller trykkbelastning kan bli anvendt i dette trinnet av prosessen. Slutt punktet for oppbrytningstrinnet kan bli bestemt ved registrering av den optiske tettheten med absorpsjon ved 260 nm av suspensjonen som vanligvis øker ved cellelysis og ved mikroskopisk observasjon. I et hvert tilfelle bør oppbrytingen foregå slik at det i vesentlig grad ikke er noen intakte celler som blir tatt med i de påfølgende trinnene.

Behandling av disruptatet for å isolere uopløselige IL-2-legemer

Etter at cellene er blitt oppbrutt blir deionisert vann fortrinnsvis tilsatt til disruptatet og mere enn 99 vekt-% av saltene blir fjernet derfra. Saltene er vann-oppløselige stoffer sammensatt av motsatt ladete ioner med liten molekylvekt. Fjerning av disse saltene for å redusere ionestyrken til disruptatet kan bli tilveiebragt ved diafiltrering ved anvendelse av deionisert vann for å vaske ut ionene eller ved sentrifugering for å pelletere det cellulære debriset og refraktile legemer etterfulgt av resuspensjon i deionisert vann. Hvis diafiltrering blir anvendt, blir fortrinnsvis deionisert vann kontinuerlig tilsatt slik at tilsetningshastigheten av vann er lik filtreringshastigheten.

Etter at saltene hovedsakelig er blitt fjernet, kan eventuelt en forbindelse såsom 1-oktanol bli tilsatt for å avsalte disruptatet, hvis det ikke er tilsatt tidligere, for å forsikre at ingen levedyktige rekombinante organismer er

tilstede før innholdet blir ødelagt. Det avsaltede disruptatet blir igjen behandlet som beskrevet ovenfor.

5 Etter den siste oppbrytingen, økes tettheten eller viskositeten og/eller blir en gradient dannet i løpet av sentrifugeringen i væsken innenfor disruptatet ved tilsetting av et stoff til disruptatet. Det er forskjellige måter å tilveiebringe denne hensikten, alle er basert på sedimentasjonskarakterene til partiklene ved variering av tettheten
10 og/eller viskositeten til væskefasen. En måte å oppnå dette målet på er å tilsette et stoff som øker tettheten av væsken til en ρ på omtrent 1,1 til 1,3 g/ml, fortrinnsvis 1,13 til 1,17 g/ml.

15 Stoffer som blir anvendt for å oppnå denne økningen av tettheten innbefatter et sukker eller en blanding av sukker, såsom, f.eks. sukrose, dekstrose, fruktose, maltose, maltotriose, og andre mono-, di- og polysakkarider. Sukkeret er fortrinnsvis sukrose. Alternativt kan et to-fase system av
20 stoffer såsom, f.eks. en glyserol/sukroseblanding bli anvendt hvori de ødelagte partiklene fordeler seg mot grensen mellom den tunge og lette fasen og kan bli eluert ved en væske/-vaskeseparasjon.

25 I tillegg, kan viskositeten til væskefasen bli øket i fra 5 til 10 cps ved en hvilken som helst egnet måte såsom tilsetting av en viskøs forbindelse, såsom f.eks. sukrose eller glyserol. En gradient blir også dannet hvis, f.eks. partiklene er i en 60 % vannholdig glyserolsuspensjon mens sentrifugerøret inneholder 80% vannholdig glyserol.
30

IL-2-inneholdende refraktile legemer blir separert fra det cellulære debriset ved sentrifugering i høy hastighet. "Sentrifugering ved høy hastighet" innbefatter spinning av
35 suspensjonen i en sentrifuge ved omtrent 8.000 til 40.000 ganger tyngdekraften (g), fortrinnsvis omtrent 10.000-

20.000 x g, i en egnet tidsperiode avhengig av volumet, generelt omtrent 10 minutter til 72 timer.

Partikkelpelleten eller massen som resulterer fra sentrifugeringen inneholder omtrent 15-70 vekt-% IL-2 bestemt ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese og ved Lowryanalyse (Lowry et al, J. Biol. Chem (1951) 193:265-275).

IL-2 i partikkelmassen eller pelleten blir deretter løst opp og denaturert ved blanding av massen/pelleten med en oppløsning av en sterk denaturerende konsentrasjon kaotrofisk middel og et reduksjonsmiddel. Det kaotrofiske middelet og reduksjonsmiddelet er i en vannholdig buffer ved pH 7 til 9, fortrinnsvis fosfatbufret saltvann eller Tris-buffer. pH-justering kan bli tilveiebragt ved tilsetning av base såsom NaOH. W/v-forholdet mellom pellet og oppløsning er vanligvis i området 0,01:1 til 0,25:1 fortrinnsvis 0,05:1 til 0,12:1. Reduksjonsmidler som kan bli anvendt i løpet av oppløsnings/denatureringstrinnet innbefatter: B-merkaptoetanol, glutatjon, cystein og ditiotreitol (DTT). DTT er det foretrukne reduksjonsmiddelet. Konsentrasjonen av reduksjonsmiddelet i mediumet er vanligvis varierende mellom 10 til 100 mM mens omtrent 50 mM er den foretrukne konsentrasjonen. Gelaterende midler såsom etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) i konsentrasjoner på 1 til 50 mM, fortrinnsvis omtrent 25 mM, og buffere såsom Tris·HCl ved konsentrasjoner på 25 til 250 mM, fortrinnsvis 50 mM, kan bli inkludert i oppløsningen. Forhøyede temperaturer i området på 35°C til 50°C, fortrinnsvis omtrent 40°C, og et nitrogenteppes kan bli anvendt i dette trinnet. Oppløsningen/denatureringen vil vanligvis være fullført etter omtrent 5 til 15 minutter blanding. Etter dette blir blandingen sentrifugert, fortrinnsvis ved 2000 x g til 4000 x g i omtrent 10 til 30 min for å fjerne eventuelt ikke-oppløste stoffer.

Denaturert IL-2 blir deretter utsatt for kontrollert oksydasjon. Reduksjonsmiddelet, sammen med andre forurensende

stoffer, blir først fjernet ved anvendelse av gelfiltrering, diafiltrering, eller presipitering. Geler som har evnen til å fjerne reduksjonsmiddel fra proteinoppløsningen er kommersielt tilgjengelig. Blant annet når DTT blir anvendt som et
5 reduksjonsmiddel kan Sephadex G-10, G-25 og G-50 geler bli anvendt. Gelfiltreringen kjøres da i en oppløsning av et kaotrofisk middel som inneholder proteinet i oppløsning. Når guanidinhydroklorid blir anvendt, er konsentrasjoner over omtrent 6 M nødvendig for å holde IL-2 i oppløsning og unngå
10 presipitering. Etter fjerning av reduksjonsmiddelet, blir proteinoppløsningen fortynnet, hvis nødvendig, med oppløsningen bestående av kaotrofisk middel til en proteinkonsentrasjon på omtrent 0,1 til 2 mg/ml, fortrinnsvis omtrent 0,25 til 1,0 mg/ml.

15 En foretrukket fremgangsmåte for å fjerne reduksjonsmiddel sammen med forurensende stoff anvender presipiteringsteknikker. Redusert IL-2 blir fortynnet til omtrent 2 - 30 mg IL-2 pr. ml, fortrinnsvis 5-10 mg IL-2 pr. ml med 7,0 M
20 guanidin. Dette blir deretter fortynnet til omtrent 1-5 M guanidin, fortrinnsvis 3,5 M guanidin, og det får stå helt til presipiteringen er fullstendig, vanligvis to timer. Når presipiteringen har satt seg, kan IL-2 bli pelletert ved sentrifugering. Gjenværende DTT kan bli fjernet ved vasking
25 av pelleten med en buffer, fortrinnsvis ved anvendelse av en 2-4 M guanidin-inneholdende buffer eller en 1-2% polysorbat 80-inneholdende buffer.

Foretrukne selektive oksydasjonsfremgangsmåter er beskrevet i
30 US-PS 4,572,798 (anvender en oksydasjonsfremmer inneholdende et Cu^{+2} kation såsom fra CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, osv.) og 4,530,787 (som anvender o-jodosobenzosyre), beskrivelsen er inkorporert heri ved referanse. Cu^{+2} innbefatter omsetting av den vannholdige oppløsningen av denatureert IL-2 ved en pH mellom
35 omtrent 5,5 og 9, fortrinnsvis 6 til 8, og mest foretrukket omtrent 7,5, i nærvær av luft med minst en effektiv mengde av en oksydasjonsfremmer inneholdende et Cu^{+2} kation. Kontrol-

lert oksydasjon forårsaket dannelsen av disulfidbroer i IL-2 som samsvarer med broene i nativt IL-2 uten eller med minimal overoksydasjon og dannelsen av ikke-samsvarende broer eller oligomerer. Slik oksydasjon muliggjør produksjon av rekombinant IL-2 med riktig disulfidbrodannelse i høyt utbytte.

Mengde oksydasjonsmiddel eller oksydasjonsfremmer som blir anvendt innbefatter minst en effektiv mengde for oksydasjon, dvs. en mengde som ved minimum vil være nødvendig for å utføre oksydasjonsreaksjonen effektivt innenfor en hensiktsmessig tidsperiode. En effektiv mengde er mengden som omtrent er ekvivalent til konsentrasjonen av frie sulfhydrylgrupper i IL-2 som er beregnet å være involvert i dannelsen av de ønskede disulfidbindingene. Mengden CuCl_2 vil fortrinnsvis variere fra omtrent 5 til 275 mikromolar. Når det gjelder o-jodsobenzosyre vil molforholdet mellom oksydasjonsmiddel og IL-2 fortrinnsvis være i området på omtrent 0,05:1 til omtrent 5:1, mest foretrukket er omtrent 0,8:1 til omtrent 1:2. Konsentrasjonen av IL-2 i reaksjonsblandingen blir holdt lav, dvs. vanligvis mindre enn omtrent 5 mg/ml, fortrinnsvis omtrent 0,05 til omtrent 2 mg/ml, og mest foretrukket er omtrent 0,1 til omtrent 1 mg/ml, for å redusere sannsynligheten for oligomerdannelse. pH blir opprettholdt mellom 5,5 og 9, fortrinnsvis mellom 7 og 8 i o-jodsobenzosyreoksyderingen.

Redusert IL-2 må forbli i oppløsning for at effektiv oksydasjon oppstår. Reaksjonsblandingen må derfor inneholde en tilstrekkelig konsentrasjon av kaotrofisk middel for å holde redusert IL-2 i oppløsning. Som indikert ovenfor, når guanidinhidroklorid blir anvendt, må dets konsentrasjon være over 6 M. Ved slike konsentrasjoner vil en vesentlig mengde av IL-2 være i en denaturert form. På grunn av dette er det når det gjelder IL-2 vanskelig å utføre oksydering og renatureringen samtidig og oppnå høye utbytter av renaturert IL-2.

Temperaturen anvendt i oksydasjonen vil normalt være mellom omtrent 20°C og 40°C, romtemperatur er hensiktsmessig. For Cu^{+2} oksydasjon, medfører en økning i reaksjonstemperatur til en økning i reaksjonshastighet. Oksydasjonsreaksjonen kan bli effektivt avsluttet ved, f.eks., redusering av pH til et nivå hvorpå reaksjonen opphører, frysing av oppløsningen, eller tilsetning av geldannere såsom EDTA til reaksjonsblandingen. Oksyderingstiden vil vanligvis være i området på 4 timer til omtrent 1 dag.

Når oksyderingen er fullført, reduseres konsentrasjonen av det kaotrofiske middelet (guanidinhydroklorid) ved anvendelse av fortynning, dialyse eller difiltrering, til et nivå som muliggjør at oksydert IL-2 blir renatureert og påny foldes til den native IL-2-konfigurasjonen. Fosfatbuffer eller Citratbuffer, 10 til 100 mM, fortrinnsvis omtrent 10 mM; NaCl, 10-150 mM, fortrinnsvis 40 mM; og sukrose, 1-5%, fortrinnsvis 2,5%, er foretrukne fortynningsmidler. IL-2 blir fortrinnsvis konsentrert ved anvendelse av en ultrafiltreringsmembran for å unngå håndtering av store volumer av oppløsningen. Konsentrasjonen av guanidinhydrokloridmiddelet blir vanligvis fortynnet eller diafiltrert til under omtrent 2 M, fortrinnsvis under omtrent 0,5 M. Fortynningen vil vanligvis bli utført ved omtrent 4°C til 25°C. Ved slike temperaturer og redusert guanidinhydrokloridkonsentrasjon presipiteres fremmede vertspoteiner. Dette presipitatet blir fjernet ved filtrering eller sentrifugering for å tilveiebringe en supernatant som inneholder oksydert, renatureert IL-2.

Renatureert, oksydert IL-2 blir deretter rensert for å fjerne endotoksiner til et nivå som oppfyller kliniske spesifikasjoner (dvs., mindre enn omtrent 0,1 ng endotoksin pr. ml IL-2). IL-2 blir også fortrinnsvis rensert for å fjerne pyrogen, for å være vesentlig fri for pyrogener ifølge målingen i U.S.P. kanin pyrogen-testen ved en dosering på $1,0 \times 10^3$ enheter/kg, fortrinnsvis $3,3 \times 10^5$ enheter/kg). Rensing kan bli tilveiebragt ved ione-byttekromatografi eller en kombina-

sjon av hydrofobe interaksjoner og ione-byttekromatografi, eller ved RP-HPLC.

Oppløsningen blir deretter sendt gjennom en ione-byttekolonne, såsom en DEAE agarose-kolonne (f.eks., Pharmacia Fast-Flow Sepharose DEAE). IL-2 blir utvunnet fra kolonnen med 10 mM citrat, pH 6,5. Eluerte IL-2 fraksjoner kan deretter bli applisert på en annen ione-byttekolonne, såsom en karboksymetylagarosekolonne (f.eks., Pharmacia Fast-Flow Sepharose CM) som binder IL-2 ved en pH på 6 til 7,4. Bundet IL-2 kan bli eluert med en økende saltgradient. Ønsket IL-2 elueres ved omtrent 150 mM salt mens former av proteinet med lavere isoelektrisk punkt blir eluert ved lavere saltkonsentrasjoner.

I den hydrofobe interaksjonsteknikken/ione-byttekromatografi-teknikken, blir $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tilsatt til IL-2-oppløsningen til en konsentrasjon på minst omtrent 1,0 M, fortrinnsvis omtrent 1,25 M. Oppløsningen blir deretter applisert på en hydrofob interaksjonskolonne, såsom en fenylagarosekolonne (f.eks., Pharmacia Phenyl Fast-Flow Sepharose kolonne). Bundet IL-2 blir utvunnet fra kolonnen med en avtagende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient, i det at IL-2 blir samlet i fraksjonene som eluerer ved omtrent 0,95 til 0,75 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. IL-2-former og andre urenheter (bakterielle vertspoteiner) som lavere isoelektriske punkter enn nativt IL-2 blir deretter utvunnet ved kation-byttekromatografi ved anvendelse av en bytter som binder IL-2 ved en pH på 6 til 7,5. En karboksymetylagarosekolonne (f.eks. Pharmacia Fast-Flow Sepharose CM) er en foretrukket preparativ kation-bytter. Oppløsningen blir brakt i kontakt med ionebytteren ved det angitte pH-området og IL-2 blir eluert fra ionebytteren ved anvendelse av en ionisk gradient. Ønsket IL-2 elueres ved omtrent 0,15 M salt mens former av proteinet som har lavere isoelektrisk punkt blir eluert ved lavere saltkonsentrasjoner.

HPLC-rensing av renaturert IL-2 kan bli utført essensielt som beskrevet i U.S. 4,569,790 etterfulgt av oppløsning i et kaotrofisk middel og dialyse. Forklart i korte trekk, blir IL-2-oppløsningen kromatografert, utfelt, og den resulterende presipiteringen blir tatt opp i den kaotrofiske middel-oppløsningen. Det kaotrofiske middelet blir deretter fjernet ved dialyse eller diafiltrering. IL-2 kan bli rensset videre ved kation-bytttekromatografi.

Renheten av renaturert, oksydert IL-2 etter kromatografitrinnene er minst omtrent 95% og vanligvis minst omtrent 98%, bestemt ved redusert natriumdodecylsulfatpolyakrylamidgellelektroforese (SDS-PAGE) analyse. Dette rene IL-2 har en oppløselighet i PBS på minst omtrent 5 mg/ml, en spesifikk aktivitet på minst 1×10^7 enheter/mg, vanligvis 5×10^6 til 2×10^7 enheter/mg bestemt ved HT-2 celle-proliferasjonsanalyse, og endotoksin-innhold på mindre enn omtrent 0,1 ng/mg IL-2. IL-2 er også fortrinnsvis vesentlig fri for pyrogener, bestemt ved U.S.P. kanin-pyrogentesten ved en dosering på $1,0 \times 10^3$ enheter/kg, mest foretrukket $3,3 \times 10^5$ enheter/kg.

Formulering

Renset IL-2 blir gjort vannholdig, dets konsentrasjon blir justert, hvis nødvendig, til 0,01 til 2 mg/ml, og en vann-oppløselig bærer blir tilsatt til det ønskede nivået. Bæreren vil vanligvis bli tilsatt slik at den er tilstede i oppløsningen ved omtrent 1 - 10 vekt-%, fortrinnsvis omtrent 5 vekt-%. Den nøyaktige mengden av bærer som blir tilsatt er ikke kritisk. Konvensjonelle faste svellemidler som blir anvendt i farmasøytiske tablettformuleringer kan bli anvendt som bærer. Disse stoffene er vannoppløselige, reagerer ikke med IL-2, og er i seg selv stabile. De er også fortrinnsvis ikke-følsomme overfor vann (dvs. ikke-hygroskopiske). Spesifikke eksempler på bærere som kan bli tilsatt innefatter dekstrose, laktose, mannitol, sukrose og andre reduserte sukkere såsom sorbitol, stivelse og stivelsehydrolysater avledet fra hvete, korn, ris og potet, mikro-

krystallinsk cellulose, og albumin såsom humant serumalbumin. mannitol, sukrose og dekstrose er foretrukket.

5 Bæreren utgjør en stor mengde av formuleringen, slik som når enhetsdoseringsmengder av oppløsningen blir frysetørret i beholdere, såsom sterile beholdere, er den fryse-tørkede resten klart synlig. I dette henseendet tilveiebringer den foretrukne bæreren, mannitol, en estetisk akseptabel (hvit, krystallinsk) rest som ikke er følsom overfor vann. Det at
10 mannitol ikke er følsom overfor vann kan forsterke stabiliteten til formuleringen.

EP publikasjon 215,658, publisert 25. mars 1987, med tittel "An Improved Formulation for Lipophilic Proteins" (Hanisch et
15 al) skisserer en forbedret fremgangsmåte for utvinning og rensing av lipofile rekombinante proteiner såsom IL-2 fra mikroorganismer, som tilveiebringer et proteinpreparat som kan bli formulert til en stabil farmasøytisk sammensetning. En slik sammensetning som inneholder en terapeutisk effektiv
20 mengde av det biologisk aktive rekombinante lipofile proteinet løst opp i et ikke-toksisk, innsatt, terapeutisk kompatibel vannholdig-basert bærermedium med en pH på 6,8 til 7,8 inneholder også en stabilisator for proteinet, såsom humant serumalbumin, normalt serumalbumin og humant plasma-
25 proteinfraksjon. Formuleringsaspektene til nevnte EP publikasjon 215,658 er inkorporert heri ved referanse som ved en alternativ formuleringsvei for rensset IL-2. EP publikasjon 215,658 skisserer en formuleringsprosess med lav pH. U.S. patentnr. 4,462,940 til Hanisch et al, skisserer en formuleringsprosess med høy pH, og formuleringsaspektene derav er
30 også inkorporert heri ved referanse.

Etter tilsetning av bærer blir enhetsdoseringsmengdene (dvs. for IL-2 volumer som tilveiebringer 0,01 til 2 mg, fortrinnsvis 0,2 til 1,0 mg, IL-2 pr. dose) av oppløsningen fordelt i
35 beholdere, beholderene blir forseglet med et lokk med spor,

og innholdene blir frysetørret ved anvendelse av konvensjonelle frysetørringsbetingelser og apparatur.

5 Det frysetørrede, sterile produktet består av en blanding av (1) IL-2, (2) bærer (dekstrose, sukrose eller mannitol), (3) eventuelt andre tilsetningsstoffer såsom humant serumalbumin, Tween 80 og lignende og (4) en liten mengde buffer som vil tilveiebringe en fysiologisk pH når blandingen er rekonstituert. Produktet kan også inneholde en mindre mengde av et
10 preserveringsmiddel for å forsterke kjemisk stabilitet. Rekombinant IL-2 utgjør vanligvis omtrent 0,015 tørrvekt-% til 10 tørrvekt-% av blandingen, fortrinnsvis omtrent 2% til 5% av blandingen.

15 Den frysetørrede blandingen kan bli rekonstituert ved injisering av en konvensjonell, parenteral vannholdig injeksjon, såsom destillert vann for injeksjon, Ringers oppløsningsinjeksjon, Hanks oppløsningsinjeksjon, dekstroseinjeksjon, dekstrose og saltinjeksjon, fysiologisk saltvanninjeksjon, eller lignende, inn i beholderen. Injeksjonen bør
20 bli tilsatt langs siden av beholderen for å unngå omfattende skumming. Mengden injeksjon som blir tilsatt til beholderen vil vanligvis være i området på 1 til 5 ml, fortrinnsvis 1 til 2 ml.

25 I en alternativ formulering, beskrevet i PCT W087/00056, publisert 15. januar 1987, med tittel "Solubilization of Recombinant Proteins for Pharmaceutical Compositions Using Homopolymer Conjugation" til M. Knauf et al, hvori beskrivelsen er inkorporert heri ved referanse, blir IL-2 reagert
30 med aktivert polymer valgt fra poetylenglykol, homopolymerer og polyoksyetylerter polyoler, såsom polyoksyetylerter glyserol. Polymeren har fortrinnsvis en molekylvekt på fra 300 til 100.000 daltons, mest fortrukket 350 til 40.000 daltons.
35 Polymeren blir aktivert ved konjugasjon med et koblingsmiddel med terminale grupper som er reaktive med både de frie amin eller tiolgruppene på proteinet og hydroksylgruppen til

polymeren. Eksempler på slike koblingsmidler innbefatter hydroksynitrobenzensulfonester, cyanursyre-klorid, og N-hydroksysuccinimid. IL-2 blir deretter formulert direkte med den vannoppløselige bærereren og buffer som beskrevet ovenfor, formuleringen blir frysetørret og den frysetørrede blandingen kan bli rekonstituert som beskrevet ovenfor.

Den rekonstituerte formuleringen fremstilt som beskrevet ovenfor er egnet for parenteral og oral administrasjon til mennesker eller andre pattedyr i terapeutisk effektive mengder (dvs. mengder som eliminerer eller reduserer pasientens patologiske tilstand) for å tilveiebringe terapi. IL-2 terapi er hensiktsmessig for forskjellige immunmodulatoriske indikasjoner, såsom T-celle-mutagenese, induksjon av cytotoxicke T-celler, økning av naturlig killercelleaktivitet, induksjon av IFN- γ , restituering og styrking av cellulær immunitet) f.eks. behandling av immundefekte tilstander), og økning av cellemediert anti-svulstaktivitet.

Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige for parenteral administrasjon, for eksempel, intravenøs, subkutan, intramuskulær, intraorbital, oftalmisk, intrakapsulær, intraspinal, intrasternal, topisk, intranasal aerosol, skarifikasjon, og også, for oral administrasjon. Foretrukne administrasjonsmåter er ved intramuskulær, subkutan og intravenøs injeksjon, og ved topisk administrasjon. Anvendelse av ikke-ioniske overflateaktive midler er spesielt foretrukket for topisk administrerte formuleringer, på grunn av deres evne til å penetrere hudoverflaten.

Følgende eksempler illustrerer fremgangsmåten og sammensetningen ifølge oppfinnelsen. Disse eksemplene er ikke ment å begrense oppfinnelsen på noen måte. I disse eksemplene er alle temperaturene i grader Celsius hvis ikke annet er angitt. Figur 1 indikerer den foretrukne fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, representert ved eksempler.

Eksempel 1

Dette eksempelet illustrerer en foretrukket fremgangsmåte for utvinning, rensing og formulering av rekombinant IL-2.

5 Des-alanyl-IL-2ser₁₂₅ ble utvunnet fra E. coli. Des-alanyl-IL-2ser₁₂₅-produserende E. coli (K12/MM294-1) -stammen som bærer plasmid pLW45 og som ble anvendt i dette eksempelet ble deponert til American Type Culture Collection 4. mars, 1984 under aksjesjonsnummer 39,626. Nevnte analog og en fremgangs-
10 måte for fremstilling er beskrevet i U.S. patentnr. 4,518,584.

E. coli som er transformert med plasmid pLW45 ble dyrket i en 1000-liter fermentor ved 37°C. Oppløst oksygen ble opprett-
15 holdt ved omtrent 40% ved, om nødvendig (1) økende rysting; (2) tilsetning av luft; og (3) tilsetning av oksygen.

Når fermentoren var fylt med vann til driftsvolumet, ble følgende sporelementer tilsatt:

20	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30 µM
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	30 µM
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	3 µM
	Na ₃ citrat · 2H ₂ O	1,5 mM
25	KH ₂ PO ₄	21 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	72 mM.

Fermentormateren og karene for tilsetning ble deretter sterilisert i henhold til standard driftsprosedyre. Deretter
30 ble de følgende sterile tilsetningsstoffer fremstilt:

	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 mM
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	72 µM
	L-tryptofan	70 mg/L
35	tiamin · HCl	20 mg/L
	glukose	50 g/L
	tetracyklin	5 mg/L.

Fermentoren ble avkjølt og inokulert med frossen eller kim E. coli-kultur ved 2 mg/L tørrvektceller. I løpet av fermenteringen, ble pH opprettholdt ved 6,8 ved anvendelse av KOH. Målinger av optisk tetthet og målinger av gjenværende glukose i prøvene ble utført ved 14 - 16 timer og deretter med intervaller på omtrent 1 time.

Induksjon av des-alanyl-IL-2ser₁₂₅ produksjon ved utelukking av L-tryptofan fra kulturmediumet oppsto ved omtrent OD₆₈₀=10 etterfulgt av tilsetning av casaminyrer til en endelig konsentrasjon på 2% ved OD₆₈₀=15. Kulturer ble høstet omtrent 3-5 timer senere.

De refraktile legemene inneholdende desalanyl-IL-2ser₁₂₅ ble deretter isolert. Det høstede stoffet ble konstrert omtrent 5-10 ganger ved sirkulering av det høstede stoffet under trykk gjennom UF-kryss-strømningsfiltreringsinnsatser med en 100 K molekylvekt-utelukking. Cellene ble ødelagt ved å bli sendt 3 ganger gjennom en disrupter (anordning for oppbryting av celler) ved omtrent 44817,5 kPa (195 atm). EDTA ble deretter tilsatt til en final konsentrasjon på 5 mM. Suspensjonen ble diafiltrert mot 5 volumer deionisert vann. Oktanol ble tilsatt til 1% (v/w) for å drepe eventuelle gjenværende levende bakterier i det diafiltrerte produktet. 2 mM EDTA ble tilsatt og etter flere timer, ble det diafiltrerte disruptatet på ny ødelagt ved å bli sendt igjennom en disrupter.

Sukrose ble satt til redisruptatet for å tilveiebringe en finaltetthet på mellom 1,1 og 1,25 g/ml. Blandingen ble sentrifugert 8.000 til 20.000 x g ved 1-2 lpm, og partikkelpelleten eller pastaen ble samlet. En temperatur på minst 20°C ble opprettholdt før og i løpet av sentrifugeringen.

Partikkelpastaen ble deretter blandet med 17 ml pr. gram pasta av en vannholdig oppløsning av mettett guanidinhydroklorid, DTT, 50 mM, Tris, 50 mM, og 25 mM EDTA, og pH ble justert til 8,0 med NaOH og oppvarmet til 40°C i omtrent 10

min. Uopløste stoffer ble fjernet fra blandingen ved sentrifugering ved 3.000 x g i 15 min.

5 Det neste trinnet i rensingen var å fjerne DTT og EDTA fra IL-2-oppløsningen (supernatanten) ved gelfiltrering ved anvendelse av en Sephadex G-25 kolonne. Kolonnen ble kjørt i 7 M guanidinhydrokloridbuffer ved pH 7,5. Ved anvendelse av et prosesskromatogram, ble IL-2 toppen samlet og toppen ble fortynnet med guanidinhydrokloridbuffer til en protein-
10 konsentrasjon på 0,5 mg/ml.

Oksydering av IL-2 ble initiert ved tilsetning av CuCl_2 i et molart forhold på 3:1 (CuCl_2 til IL-2). Oksyderingen ble utført ved omtrent 25°C i 7 M guanidinhydroklorid, 10 mM
15 fosfat. pH-en ble kontrollert til $7,5 \pm 0,2$ i løpet av oksyderingen og 4 mM EDTA ble tilsatt når oksydasjonen var fullført. På grunn av at oksydert IL-2 er mere hydrofil enn redusert IL-2, ble fremdriften av oksydasjonsreaksjonen registrert ved RP-HPLC.
20

Den resulterende oppløsningen av oksydert IL-2 ble deretter fortynnet med 10 mM fosfatbuffer for å redusere guanidinhydrokloridkonsentrasjonen til 2 M. IL-2-konsentrasjonen ble deretter øket til 2,5 mg/ml ved anvendelse av en hul fiber-
25 membran-ultrafiltreringsenhet med en utelukking på 10.000 dalton. Oppløsningen ble deretter videre fortynnet med 10 mM fosfatbuffer til 0,2 M guanidinhydroklorid og latt stå over natt ved 4°C for å tilveiebringe et presipitat.

30 Presipitatet bestående av fremmede E. coli-proteiner og noe IL-2 ble deretter fjernet ved filtrering med et cellulose-acetat-filter for å tilveiebringe omtrent 85% utbytte av påny foldet IL-2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ble deretter satt til supernatanten til en konsentrasjon på 1,25 M. Denne oppløsningen ble
35 applisert på en Pharmacia Phenyl Fast-Flow Sepharose hydrofob interaksjonskolonne. IL-2 ble utvunnet fra kolonnen med en avtagende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient, idet IL-2 ble samlet i fraksjo-

nene ved omtrent 0,95 til 0,75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De sammenslåtte fraksjonene ble diafiltrert og deretter applisert på en Pharmacia karboksymetyl (CM) Fast-Flow Sepharose ionebyttekolonne ved pH 7 ekvilibrert med 10 mM fosfatbuffer. IL-2-fraksjonene ble utvunnet ved 0,15 M NaCl.

Det resulterende IL-2 hadde en renhet på 98% ifølge SDS-PAGE-analyse og var homogen ifølge HPLC-analyse. Dets spesifikke aktivitet var 8×10^6 enheter/mg ifølge måling ved HT-2-celleproliferasjonsanalyse. Enzym-bundet immunosorbentanalyse (ELISA) ble utført for å bestemme om dette renaturerte, rekombinante IL-2 (guanidin-prosess IL-2) ble bundet til polyklonale antistoffer som blir bundet til rekombinant IL-2 fremstilt ved fremgangsmåten beskrevet i US Patentnr. 4,569,790, og denne fremgangsmåten er inkorporert heri ved referanse, hvori IL-2 blir løst opp med SDS (SDS-prosess IL-2). Serum fra en pasient behandlet med SDS-prosess IL-2 ble fortynnet 1:1000 i analysebuffer (PBS med 0,5% BSA og 0,05% Tween 20) og blandet med SDS eller guanidin-prosess IL-2 i finale konsentrasjoner på 0 til 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Etter inkubasjon i to timer ved romtemperatur, ble blandingen applisert i volumer på 100 μl til 96 brønn mikroelisa-plater (Immulon I, Dynatech) tidligere belagt med SDS-prosess IL-2 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 0,05 M Na_2CO_3 , pH 9,6, 100 $\mu\text{l}/\text{brønn}$). Blandingene ble stående i de IL-2-belagte brønnene i 30 minutter, og deretter ble platene grundig vasket i PBS med 0,05% Tween 20, og peroksydase-konjugert geit anti-humant IgG (Cappel, 1:1000 fortynning) ble tilsatt. Etter inkubasjon i to timer til, ble det andre antistoffet fjernet og substrat ble tilsatt (OPD, Sigma, 100 $\mu\text{l}/\text{brønn}$). Den enzymatiske reaksjonen ble avsluttet 20 minutter senere ved tilsetning av 50 μl 2N HCl til hver brønn. Absorbansen ved 490 nm ble målt ved anvendelse av en Dynatech MR580 plateavleser (referansebølgelengde 405 nm). Grafiske fremstillinger av absorbans i mot mengden av konkurrerende antigen er vist i figur 2. Som vist, konkurrerte guanidin-prosess IL-2 ikke i tilstrekkelig grad.

Eksempel 2

Eksempel 1 ble gjentatt gjennom IL-2-refoldingstrinnet (utvinning av supernatant etter reduksjon av guanidinhydroklorid til 0,2 M).

5

IL-2-oppløsningen (8,8 mg protein) ble surgjort med trifluoreddiksyre til en pH på 2,1 og deretter sentrifugert for å fjerne eventuelt presipitat. Denne ble applisert på en 1,25 cm ganger 30 cm kolonne av Vydac C-4 silisiumoksyd ekvilibrert med 0,1% trifluoreddiksyre i vann. Kolonnen ble eluert med en gradient bestående av acetonitril inneholdende 0,1% trifluoreddiksyre. Fraksjonene med rent IL-2 ble slått sammen og deretter dialysert inn i 7 M guanidin pH 7,5 buffer. Denne ble deretter dialysert mot 10 mM fosfatbuffer pH 7,0. Et presipitat ble fjernet ved mikrosentrifugering og 68% av IL-2 i supernatanten ble utvunnet.

15

Eksempel 3

Eksempel 1 ble gjentatt gjennom utvinning av den refraktile legemepartikkelpasta.

20

Omtrent 113,7 g fast guanidin (7 M sluttkonsentrasjon) ble satt til ~14 g partikkelpasta etterfulgt av tilsetning av 10 mM Tris/2 mM EDTA-buffer til omtrent 190 ml. Etter homogenisering, ble ~1,5 g fast DTT (50 mM final konsentrasjon) tilsatt og pH-en ble justert til 8-8,5 med NaOH. Oppløsningen ble varmet opp til 50°C i 15 min. for å fremme reduksjonen. Oppløsningen ble deretter fortynnet med 10 mM Tris/2 mM EDTA til et finalt volum på 200 ml.

25

Det neste trinnet i rensingen innbefattet å fjerne reduksjonsmiddelet og andre forurensninger fra IL-2-stoffet. Omtrent 25 ml redusert IL-2 ble fortynnet til omtrent 5-10 mg IL-2/ml med 75 ml 7,0 M guanidin. Denne oppløsningen ble fortynnet til 4,8 M guanidin med Tris/EDTA-buffer og fikk stå i to timer. Veldig lite presipitat ble dannet, og presipitatet ble fjernet ved sentrifugering ved 10.000 x g i 15

35

minutter. Supernatanten ble fortynnet til 4,0 M guanidin med Tris/EDTA-buffer og latt stå i 2 timer ved romtemperatur. Det tunge presipitaet ble samlet ved sentrifugering (10.000 g x 15 min.).

5

Pelleten ble vasket en gang med 50 ml 2% Tween 80 og to ganger med 50 ml H₂O. 16,7 g fast guanidin ble tilsatt og oppløsningen ble bragt til 25 ml med vann. Oppløst IL-2 ble fortynnet til 1 mg/ml med 7,0 M guanidin i 10 mM Citrat, pH 6,5. CuCl₂ (til 0,1 mM) ble tilsatt og pH ble justert til 8-8,5. Denne oppløsningen ble omrørt over natt.

10

Ved anvendelse av YM-spiral-tvunnet innsats, ble guanidin diafiltrert ut og IL-2 ble konsentrert til omtrent 2 mg/ml. Luften ble fjernet fra systemet på grunn av at oppløselig IL-2 er følsom overfor risting, spesielt med luftbobler. Den ble diafiltrert mot 10 volumer 2,5% sukrose og 140 mM NaCl i 10 mM NaCitrat pH 6,5 oppløsning. Etter sentrifugering ved 3000 g x 15 min., ble 600 ml supernatant inneholdende 0,63 mg/ml IL-2 samlet. Ione-styrken ble redusert ved dialyse i 10 mM NaCitrat, pH 6,5 før fortsettelsen.

15

20

Kromatografien besto av to kolonner, hver ekvilibrert med 10 mM NaCitrat pH 6,5 buffer. Den første kolonnen var pakket med DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia). 25 ml 0,63 mg IL-2/ml i 10 mM NaCitrat pH 6,5 ble kjørt gjennom en 1 x 10 cm kolonne ved 0,5 ml/minutt. NaCl-konsentrasjonen til de sammenblandede fraksjonene ble justert til 40 mM NaCl. Den andre kolonnen ble pakket med CM Sepharose Fast Flow (Pharmacia). 28,5 ml 0,38 mg IL-2/ml ble applisert ved 0,5 ml/min. IL-2 ble bundet til gelen og ble eluert med en økende NaCl-gradient (40-400 mM NaCl i 10 mM NaCitrat pH 6,5, 0,3 ml/min) i løpet av 6 timer. Omtrent 12,6 ml 0,71 mg IL-2 pr. ml ble slått sammen.

25

30

35

CM-blandingen ble avsaltet inn i 10 mM natriumcitrat pH 6,5 over G25 Sephadex for å fjerne NaCl og for å tilveiebringe en godt karakterisert buffer for formulering.

Det resulterende IL-2 hadde en renhet på over 99% ifølge analytisk RP-HPLC.

5 Eksempel 4

Omtrent 5 ml IL-2-inneholdende refraktile legemer, blandet med et likt volum vann ble løst opp i guanidin-buffer. Oppløsningen hadde en guanidinkonsentrasjon på 7 M og et volum på 35 ml. pH til oppløsningen ble justert til omtrent 8,0 med 3 M Tris base. Deretter ble 0,3 g DTT tilsatt og oppløsningen ble oppvarmet til omtrent 45°C i 15 min. Oppløsningen ble deretter fortynnet med et likt volum 0,1 M citrat pH 5,0 buffer og latt stå i 1,5 timer. Det dannede presipitatet ble separert ved sentrifugering (10.000 x g i 10-20 min.). Presipitatet ble vasket fire ganger med 70 l 3,5 M guanidin og to ganger med 70 ml vann. Presipitatet ble løst opp i 7 M guanidin og ble analysert ved revers fase HPLC. Omtrent 265 mg IL-2 ble utvunnet med en renhet på omtrent 90%.

20 Det som er beskrevet ovenfor viser at foreliggende fremgangsmåte tilveiebringer følgende fordeler: (1) enkel rensningsprosess, (2) fravær av oppløsningsmiddel i det endelige produktet og (3) rekombinant IL-2-produkt som fremkommer mindre immunogent enn det som er tidligere blitt fremstilt.

25

I tillegg til vektorsystemet som er beskrevet tidligere og som anvender trp-promoter for IL-2-ekspressjon, innbefatter alternative vektorsystemer anvendelse av lambda pL-promoter og/eller et positivt retroregulatorisk element. Disse vektorsystemene er beskrevet i US patentnummeret 4,711,845, publisert 8. desember 1987 og 4,666,848 publisert 19. mai 1987, beskrivelsene av begge er inkorporert heri ved referanse.

35 Vektorsystemer beskrevet i de førnevnte patentene, samt flere vektorer tilveiebragt som nedenfor, er blitt deponert til American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn

Drive, Rockville, Maryland med hensyn på "the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations thereunder" og er dermed opprettholdt og gjort tilgjengelig i henhold til betingelsene i "the Budapest Treaty".

De deponerte plasmidene er blitt tildelt følgende ATCC deponeringsnummer:

<u>Plasmid</u>	<u>ATCC nr.</u>	<u>Deponeringsdato</u>
pFC54 i E. coli DG95 lambda (N ₇ N ₅₃ cI857SusP ₈₀)	39831	4. sept. 1984
pFC54.t i E. coli DG95 lambda	39789	31. juli 1984
pHCW701 i E. coli K12 MM294	39857	8. juni 1984
pLW1 i E. coli K12 MM294	39405	25. juli 1983
pLW46 i E. coli K12 MM294	39452	29. sept. 1983
pLW55 i E. coli K12 MM294.1	39516	29. sept. 1983
pSY3001 i E. coli K12 MM294	39949	19. des. 1984

Modifikasjoner av de ovenfor beskrevne metoder for utføring av oppfinnelsen som er innlysende for fagmannen innenfor biokjemi og relaterte områder er antatt å være innenfor rammen av følgende krav.

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for utvinning av rensset renatureert rekombinant
interleukin-2 (IL-2) fra en transformert mikroorganisme som
inneholder IL-2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n :

(a) ødelegger cellemembranen og celleveggen til mikro-
organismen;

10

(b) separerer vannuopløselig IL-2-inneholdende materialet
fra disruptatet;

15

(c) blander det uopløselige IL-2-inneholdende materialet fra
trinn (b) ved en pH på omtrent 7 til omtrent 9 med en
vannholdig oppløsning av et guanidinsalt på minst 6M og et
reduksjonsmiddel hvorved IL-2 i det uopløselige materialet
blir løst opp og denatureert;

20

(d) presipiterer IL-2 ut av den IL-2-inneholdende oppløs-
ningen og utvinner presipitatet;

(e) oppløser av IL-2-presipitatet;

25

(f) oksyderer IL-2 i oppløsningen, mens konsentrasjonen av
det kaotrofiske middelet blir opprettholdt ved en sterk
denaturerende konsentrasjon hvorved den naturlige disulfid-
broen i IL-2 dannes;

30

(g) etter at oksyderingen i trinn (f) er fullført, reduseres
guanidinkonsentrasjonen i oppløsningen slik at oksydert IL-2
blir renatureert og et presipitat dannes;

35

(h) separerer presipitatet fra trinn (g) fra oppløsningen for
å tilveiebringe en supernatant;

(i) renser oksydert IL-2 i supernatanten ved (1) revers-fase høy prestasjon-væskekromatografi etterfulgt av at man oppløser de sammenblandede fraksjonene i en oppløsning av kaotropisk middel og fjerner det kaotropiske middelet fra oppløsningen, eller (2) hydrofob interaksjonskromatografi kombinert med ionebytte-kromatografi, eller (3) ionebytte-kromatografi; og

(j) utvinner et rensset oksydert, oppløselig heterolog human IL-2-sammensetning med et IL-2-innhold på minst omtrent 95% som bestemmes ifølge redusert natriumdodecylsulfatpolyakrylamidgelelektroforese-analyse, en oppløselighet i fosfatbufret saltvann på minst 3 mg IL-2 per ml, en spesifikk aktivitet på minst omtrent 1×10^7 enheter/mg som bestemmes ifølge HT-2 celleproliferasjonsanalyse, og et endotoksininnhold på mindre enn omtrent 0,1 nanogram pr. mg IL-2.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at det kaotrofiske middelet som anvendes er guanidinhidroklorid og den sterkt denaturerende konsentrasjonen er minst omtrent 6 M.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at IL-2-presipitatet i trinn (e) dannes ved reduisering av guanidinhidroklorid-konsentrasjonen til under omtrent 5 M.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, karakterisert ved at guanidinhidroklorid-konsentrasjonen som anvendes er omtrent 3 til 4 M.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, karakterisert

v e d at IL-2-presipitatet samles ved sentrifugering og vaskes med en buffer før trinn (e).

6.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at bufferen som anvendes innbefatter omtrent 2-4 M guanidinhydroklorid.

7.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at oksyderingen er en kontrollert oksydering som anvender Cu^{+2} ionet som er en oksydasjonsaktivator eller o-jodsobenzosyre som et oksydasjonsmiddel.

15 8.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d man i trinn (g) reduserer konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 2 M.

20 9.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at reduksjonsmiddelet er ditiotreitol; i trinn (d) presipiteres IL-2 ved å redusere konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 5 M; oksydasjonen er en kontrollert oksydasjon som anvender Cu^{+2} ioner som en oksydasjonsaktivator; i trinn (g) reduseres konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 0,5 M; og i trinn (i) renses oksydert IL-2 i supernatanten ved ione-bytte-kromatografi ved å anvende en DEAE Sepharose-kolonne og
30 karboksylmetyl Sepharose-kolonne.

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at reduksjonsmiddelet er ditiotreitol; i trinn (d)
35 presipiteres IL-2 ved å redusere konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 5 M; oksydasjonen er en kontrollert oksydasjon som anvender Cu^{+2} ionet som en

oksydasjonsaktivator; i trinn (g) reduseres konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 0,5 M; og i trinn (i) renses oksydert IL-2 i supernatanten ved revers-fase høy utførelse vask-kromatografi.

5

11.

Frengangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at reduksjonsmiddelet er ditiotreitol; i trinn (d) presipiteres IL-2 ved å redusere konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 5M; oksydasjonen er en kontrollert oksydasjon som anvender Cu^{+2} ionet som en oksyderingsaktivator; i trinn (g) reduseres konsentrasjonen av guanidinhydroklorid til under omtrent 0,5 M; og i trinn (i) renses oksydert IL-2 i supernatanten ved hydrofob interaksjonskromatografi ved anvendelse av en fenylagarosekolonne og ionebyttekromatografi ved anvendelse av en karboksymetylagarosekolonne.

10

15

12.

Frengangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, k a r a k t e r i s e r t v e d at IL-2 er des-ala-IL-2_{ser125}.

20

13.

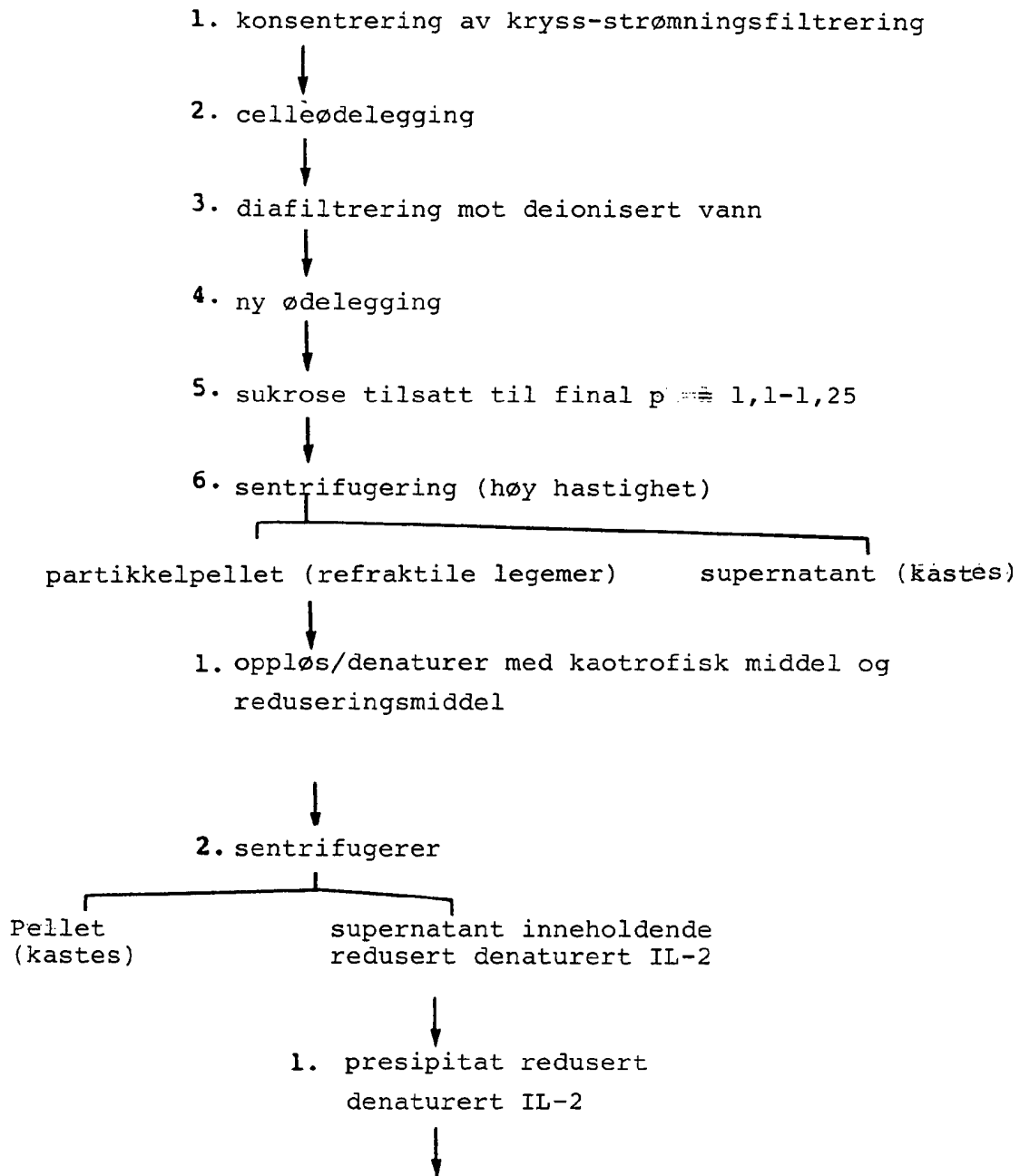
Frengangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at IL-2-sammensetningen er vesentlig fri for pyrogenener som bestemmes ved U.S.P. kanin pyrogentesten ved en dosering på $1,0 \times 10^3$ enheter pr. kg.

30

35

FIG. 1

Celler som inneholder rekombinant IL-2



(fortsetter) →

FIG. 1

(FORTS.)

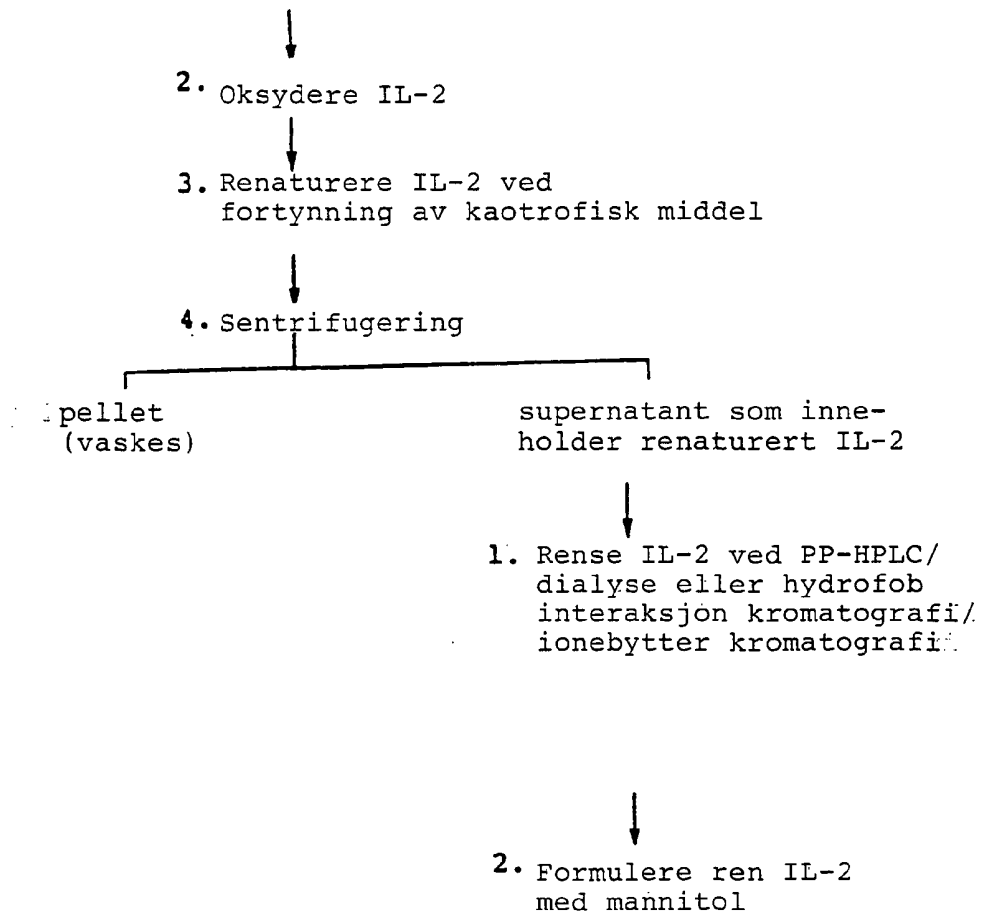


FIG. 2

