

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 160617 B

(21) Patentansøgning nr.: 4981/83

(22) Indleveringsdag: 31 okt 1983

(41) Alm. tilgængelig: 02 maj 1984

(44) Fremlagt: 02 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 01 nov 1982 US 438129

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 15/26
C 07 K 3/24
A 61 K 45/02

(71) Ansøger: *GENENTECH INC.; 460 Point San Bruno Blvd.; South San Francisco; CA, 94080, US

(72) Opfinder: Paul Douglas *Johnston; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) **Fremgangsmåde til fjernelse af oligomere og langsom monomer fra leukocyt-interferon (IFN-alfa)-præparater**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4981-83

Urenheder fjernes fra leukocyt-interferon-præparater ved inkubation af en pufferopløsning indeholdende 1 - 20 mg/ml leukocyt-interferon ved en pH-værdi mellem 3 og tilnærmelsesvis 4,8 i fra 30 minutter til 24 timer ved 28 - 40 °C og fjernelse af det dannede bundfæld. Ved denne særlige inkubationsprocedure fjernes såvel oligomere som langsom monomer af leukocyt-interferonet fra præparatet, og der opnås nativt leukocyt-interferon.

DK 160617 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fjernelse af urenheder i præparater af leukocyt-interferon, som øjensynligt stammer fra dissociering og reassociering af disulfidbindinger under rensningsprocessen. Nærmere
5 bestemt angår opfindelsen en hidtil ukendt og effektiv procedure til fjernelse af disse urenheder fra det rensede interferon.

Humant leukocyt-interferon (HuIFN- α) er repræsentativt for leukocyt-interferoner (IFN- α), som oprindeligt er
10 produceret af celler fra hvirveldyr af forskellige arter, der har nogen grad af sekvenshomologi, f. eks. okseleukocyt-interferon og leukocyt-interferoner fra hunde-, fiske- eller fuglearter. HuIFN- α vides at eksistere i flere former, almindeligvis betegnet som formerne
15 A - K, dvs. f. eks. HuIFN- α A og HuIFN- α D. Nogle af disse er blevet udtrykt i E. coli i udvindelige mængder som resultat af rekombinant-DNA-teknik og isoleres almindeligvis fra disse kulturer ved anvendelse af en monoklonal-antistof-søjle som beskrevet i Staehlin et al.,
20 J. Biol. Chem., 256: 9750 (1981). Det har vist sig, at således isoleret interferon indeholder forureninger, som viser sig at være produkter af dissociering og reassociering af disulfidbindinger i det native protein. Disse forureninger er oligomere former, som udviser multipla
25 af det monomere proteins molekylvægt, når de underkastes størrelsesbestemmelse ved SDS-PAGE under ikke-reducerende betingelser, og også en "langsom monomer", som vandrer lidt langsommere ved SDS-PAGE gennemført under ikke-reducerende betingelser.

30 En undertype, HuIFN- α A, antages at indeholde sulfhydryl-grupper på aminosyrerne nr. 1, 29, 98 og 138. I den native form svarer konformationen af molekylet til bindinger af disse grupper mellem aminosyrerne 1 - 98 og 29 -

138. Det antages at 29 - 138 bindingen er nødvendig for aktivitet, men at aktiviteten vil bevares, selv hvis 1 - 98 bindingen brydes. Selv om opfindelsen ikke skal anses for at være afhængig af nogen bestemt teori om oprindelsen til forureningerne, antages det nu i tilfælde af HuIFN- α A, at "langsom monomer" er dannet ved brydning af 1 - 98 bindingen, medens 29 - 138 bindingen forbliver intakt, og at sættet af oligomere, som er mindre aktive eller slet ikke aktive, afhængigt af størrelsen, repræsenterer bindingen af et molekyle interferon til et andet igennem nye disulfidbindinger. Tilstedeværelsen af oligomererne viser sig at skade aktiviteten af det native HuIFN- α A; den langsomme monomer er i sig selv aktiv, men kan være immunogen. Derfor vil det være meget ønskeligt at adskille den native form fra disse forureninger.

Det har været muligt at fjerne oligomeren fra præparatet ved gelpermeationsteknik. Imidlertid er udvindingen ikke særlig god, og metoden kan ikke adskille den langsomme monomer fra den native form.

Opfindelsens formål er at angive en fremgangsmåde til fjernelse af langsom monomer og oligomere fra HuIFN- α -præparater og fra præparater af andre leukocyt-interferoner med tilstrækkelig sekvenshomologi med HuIFN- α , hvorved det native protein kan isoleres i et højt udbytte frit for både oligomere og langsom monomer.

Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er ejendommelig ved, at en opløsning indeholdende IFN- α i en koncentration på 1 - 20 mg/ml og pufret til en pH-værdi mellem 3 og 4,8 inkuberes ved en temperatur på 28 - 40 °C i fra 30 minutter til 24 timer til udfældning af de angivne uønskede materialer, som derpå

kan fjernes ved standardprocedurer, såsom centrifugering eller filtrering.

På tegningen viser figur 1 og 2 analysen af en HuIFN- α -opløsning før og efter udøvelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, under anvendelse af (A) TSK-HPLC og (B) ikke-reducerende SDS-PAGE, kvantiseret ved densitometri. (C) I hver figur repræsenterer de tabellerede data fra (A) og (B).

Fig. 1 henfører til fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemført ved 32 °C og i et koncentrationsniveau på 4,2 mg/ml HuIFN- α .

Fig. 2 henfører til fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemført ved 37 °C og i et koncentrationsniveau på 7,2 mg/ml HuIFN- α .

Fig. 3 viser en sammenligning af resultaterne fra reducerende og ikke-reducerende SDS-PAGE.

Fig. 4 viser fraskillelsen af oligomere fra et HuIFN- α -præparat ved gelpermeationschromatografi.

A. Definitioner

SDS-PAGE (natriumdodecylsulfat-polyacrylamid-gelelektrophorese) er en elektrophoretisk teknik, som adskiller stoffer efter molekylvægt. Som gennemført i denne beskrivelse udføres SDS-PAGE hyppigt under ikke-reducerende betingelser fremfor i nærvær af reduktionsmidler, såsom β -mercaptoethanol eller dithiothreitol (DTT). Disse eller andre sådanne reagenser reducerer alle disulfidbindinger til de tilsvarende sulfhydrylgrupper. Derfor henfører "ikke-reducerende SDS-PAGE" til denne teknik

udført i fravær af ethvert reduktionsmiddel, såsom β -mercaptoethanol.

Denne forskel er særlig vigtig for den foreliggende opfindelse, da SDS-PAGE gennemført under indvirkning af reduktionsmiddel ikke vil afsløre tilstedeværelsen af nogle af de urenheder, som søges fjernet. Som anført mere fuldstændigt i det efterfølgende eksempel 4 ændres visse urenheder i præparatet, når der er reduktionsmiddel til stede, således at de vandrer til den samme position som nativt IFN- α . Kun når elektrophoresen gennemføres under ikke-reducerende betingelser, ses tilstedeværelsen af disse urenheder.

"TSK-HPLC" henfører til en størrelsesadskillende chromatografisk teknik med anvendelse af en molekyksi under højt tryk. Acronymet er dannet af handelsnavnet for en kommercielt tilgængelig gel i kombination med HPLC (højtryks-væskechromatografi).

"HuIFN- α " henfører til humant leukocyt-interferon, som er opnået fra enhver kilde. Dette interferon kan f. eks. isoleres fra humane celler eller fra transficeret E. coli, som udtrykker HuIFN- α på grund af rekombinant-DNA-teknik. I hvert tilfælde henfører HuIFN- α til præparater, som indeholder både den "native" form af proteinet og omlejringsprodukter heraf, hvor disse omlejringsprodukter er dannet ved fremgangsmåder, som ikke involverer ændring af aminosyresekvensen i interferonet. Som anført ovenfor vides HuIFN- α nu at forekomme som en stærkt bevaret familie af proteiner, betegnet alfa-betisk HuIFN- α A til HuIFN- α -K.

"IFN- α " henfører i denne beskrivelse til leukocyt-interferoner i almindelighed, som har tilstrækkelig sekvenshomo-

logi med HuIFN- α til at kunne underkastes fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Okse-leukocyt-interferon vides at have en sådan homologi; interferoner afledt af leukocytter af andre arter er ikke blevet tilstrækkeligt undersøgt til at fastslå deres sekvenser. Imidlertid antages det for tiden, at homologien med HuIFN- α for i det mindste pattedyr-IFN- α af alle arter vil være tilstrækkelig.

"Nativt IFN- α " henfører til den del af IFN- α , som antages at være tredimensionalt i det væsentlige identisk med det, der normalt produceres af cellen. Efter prøvning ved ikke-reducerende SDS-PAGE sættes nativt HuIFN- α i forbindelse med et bånd, som svarer til molekyelvægt 17 200, kalibreret konventionelt. Nativt IFN- α kaldes også somme tider "hurtig monomer" på grund af dets vandring ved SDS-PAGE i sammenligning med en urenhed - "langsom monomer", som er defineret nedenfor.

"Langsom monomer" henfører til IFN- α , som opfører sig anderledes ved ikke-reducerende SDS-PAGE, dvs. HuIFN- α vandrer ved en kalibreret molekyelvægt på 18 300 dalton, lidt bagefter båndet, der forbindes med nativt HuIFN- α . Det antages, at denne form er blevet ændret i rumlig konfiguration, antageligvis ved afbrydelse af en af disulfidbindingerne.

"Oligomere" henfører til IFN- α , som er delvis polymeriseret. Antageligvis stammer disse kondensationsprodukter af IFN- α fra dannelse af disulfidbindinger mellem separate molekyler af monomeren. Oligomere inkluderer dimere, trimere, tetramere og kombinationer med højere molekyelvægt. Oligomerene vandrer tilnærmelsesvis ifølge deres molekyelvægte ved ikke-reducerende SDS-PAGE.

"Urenheder" inkluderer de specificerede oligomere og

5 langsom monomere former af IFN- α såvel som andre cellekomponenter, der normalt findes i forbindelse med IFN- α i værtscellen eller det omgivende medium. I denne beskrivelse inkluderer "værtscelle" enhver leukocyt-interferon-producerende kultur, herunder hvide blodceller fra den pågældende organisme og transficerede bakterier, men ikke begrænset hertil.

B. Almen procedure

10 Det IFN- α -præparat, der tjener som udgangsmateriale for fremgangsmåden ifølge opfindelsen, fremstilles f. eks. ved kendte metoder, f. eks. separation ved påsætning på en passende antistofsøjle efterfulgt af yderligere koncentrering under anvendelse af kendt teknik. Ethvert præparat, som indeholder langsom monomer og/eller
15 oligomere såvel som nativt IFN- α , kan selvfølgelig anvendes, uanset oprindelse.

Foretrukne udgangsmaterialer for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er pattedyr-IFN- α , især HuIFN- α og okse-IFN- α . Særligt foretrukket er HuIFN- α A, en af de flere
20 kendte former af humane leukocyt-interferoner.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bringes et IFN- α -præparat til en pH-værdi mellem 3 og 4,8, fortrinsvis fra 3,5 til 4,2, ved titrering. Koncentrationen af IFN- α i præparatet (som stammer fra isoleringsproceduren)
25 er i området 1 - 20 mg/ml, fortrinsvis 5 - 10 mg/ml. Proteiners egenskaber i opløsning gør det ønskeligt at opretholde et passende niveau af ionstyrke i opløsningen for at forhindre mulige denatureringer; derfor holdes IFN- α -opløsningen ved en passende ionstyrke med
30 et eller flere passende salte, såsom ammoniumacetat eller natriumchlorid.

Et klart acceptabelt område for total saltkoncentration er 0,01 - 0,4 M, fortrinsvis 0,1 - 0,2 M, selv om ydergrænserne for tilladelig ionstyrke ikke er klart defineret. Ethvert acceptabelt salt, der stemmer overens med det ønskede pH-område, kan anvendes. Denne opløsning inkuberes derpå ved en temperatur på 28 - 40 °C, fortrinsvis 30-34 °C, i fra 30 minutter til 24 timer, fortrinsvis 10 - 14 timer. Der dannes et bundfald, som indeholder langsom monomer og oligomerene. Bundfaldet fjernes f. eks. ved centrifugering eller filtrering, fortrinsvis centrifugering. Supernatanten (eller filtratet) indeholder derefter i det væsentlige rent nativt IFN- α .

C. Eksempler

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 1

Fjernelse af urenheder omfattende oligomere og langsom monomer fra et HuIFN- α A-præparat

HuIFN- α A indeholdende 33 % oligomere og 12,9 % langsom monomer blev tilvejebragt fra Hoffman-La Roche, Inc. (Roche Prep). Dette præparats specifikke aktivitet var større end 1×10^8 enh./mg ifølge antivirale prøvninger for cytopatisk virkning (CPE) på HeLa- og MDBK-celler udsat for vesiculær-stomatitis-virus som beskrevet af Wetzel et al., J. Interferon Res, 1: 381 (1981), der betragtes som inkorporeret heri ved denne henvisning.

HuIFN- α A-præparatet blev tilvejebragt i en koncentration på 4,2 mg/ml (bestemt ved OD ved 280 nm) opløst

i 25 mM ammoniumacetat, pH 5,0, 0,12 M natriumchlorid.
5 ml af denne opløsning blev titreret til pH 4,0 med
eddikesyre og inkuberet i 12 timer ved 32 °C under lejlig-
hedsvis omrøring. Bundfald blev iagttaget efter en halv
5 time.

Suspensionen blev centrifugeret i 15 minutter ved
10 000 omdr./min., og supernatanten blev udvundet og
kombineret med to vaskeopløsninger fra pillerne. (Vask-
ningerne blev udført med 2 timers kontakttid hver).

10 De kombinerede supernatanter blev sammenlignet med ud-
gangsmaterialet efter flere kriterier. Disse resultater
er belyst i fig. 1:

TSK-HPLC blev anvendt til opnå adskillelse og analyse
af monomere og oligomere former af HuIFN- α A. (Denne
15 teknik adskiller ikke hurtig fra langsom monomer).

TSK-HPLC blev gennemført under anvendelse af en Altex
u-Spherogel TSK 2000 SW søjle (diameter 0,75 cm, længde
60 cm). 2 - 10 μ g protein blev leveret til injektion,
og søjlen blev elueret med 0,2 M kaliumphosphat, pH
20 6,8 med en strømningshastighed på 0,5 ml/min. Protein
blev sporet ved hjælp af optisk tæthed ved 214 nm, og
søjlen blev kalibreret med molekylvægtstandarderne:
Aldolase 158K, BSA 67K, ovalbumin 45K og chymotrypsinogen
A 25K.

25 Analyse af TSK-HPLC resultaterne viste, at supernatanten
indeholdt 98,8 % i den monomere form med kun 1,2 % for-
urening med dimer og uden oligomere med højere mole-
kylvægt.

Ikke-reducerende SDS-PAGE gennemført ved fremgangsmåden ifølge Laemmli, Nature, 277: 680 (1970), der betragtes som inkorporeret i denne beskrivelse med denne henvisning, og kvantiseret under anvendelse af Coomassie Blue farvning efterfulgt af laserdensitometri (LKB 2202 Ultrascan Laser Densitometer med H.P. 3390A Integrator) viste 99,8 % af den native monomer, 0,2 % af den langsomme monomer og ingen oligomer.

Procentudbyttet af nativt HuIFN- α A blev bestemt ved anvendelse af modificerende faktor på det totale protein målt i henholdsvis supernatanten og udgangsmaterialet. Hver blev modificeret med procenten af det totale protein, som kunne tilskrives hurtig monomer bestemt ved SDS-PAGE som angivet i det forudgående afsnit. Total protein blev bestemt ved målinger af optisk tæthed ved 280 nm, idet der blev antaget en extinktionskoefficient på 1,06 for en 1 mg/ml opløsning. Resultaterne af disse proteinprøvninger viste 73 % genvinding af nativt HuIFN- α A i supernatanten.

(1)

20 EKSEMPEL 2

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt under anvendelse af en frisk prøve af Roche Prep, undtagen at der ved inkubationen/fældningen anvendtes en prøve på 7,2 mg/ml indeholdende 1,8 mg protein og 37 °C. (Se eksempel 3 m.h.t. proceduren til ændring af HuIFN- α A-koncentrationen). Resultaterne, som er angivet i fig. 2, viser at supernatanten indeholdt 99,9 % nativt HuIFN- α A med kun 0,1 % langsom monomer som forurening. Imidlertid var procentudbyttet af det native HuIFN- α A kun 43 %.

EKSEMPEL 3Sammenligning af forskellige inkubationsbetingelser

- 5 Virkningerne af at variere inkubationstiden, pH-værdien, koncentrationen af HuIFN- α A og temperaturen blev undersøgt under anvendelse af grundproceduren fra eksempel 1 med de følgende modifikationer. (Igen anvendtes Roche Prep; men i nogle forsøg anvendtes et Genentech HuIFN- α A-præparat (Genentech Prep), som ved prøvning viste 86 % nativt HuIFN- α A).
- 10 For at variere pH-værdien blev præparatet titreret til den ønskede pH-værdi med eddikesyre.
- 15 For at variere koncentrationen af HuIFN- α A blev præparatet fortyndet til det dobbelte og dialyseret over for 25 mM ammoniumacetat, pH 4 i 12 timer, derpå lyophiliseret og genopløst i 25 mM natriumacetat, pH 4,0, 0,1 M natriumchlorid til den ønskede koncentration. Alternativt blev den leverede opløsning, hvis der ønskedes lavere koncentrationer, fortyndet direkte med 25 mM natriumacetat, pH 4,0, 0,1 M natriumchlorid. Resultaterne af variationen i parametre er vist nedenfor for 12 timers inkubationstider.
- 20

Temp.	[HuIFN- α A]	% Udbytte +	SDS-PAGE %			TSK-HPLC %				
			Hurtig	M	Langsom	M	D	I	Monomer	D
32 °C	7,2 mg/ml	58	99,2		0,8	-	-	98,5	1,5	-
32 °C	4,2 mg/ml	78	98,5		1,0	0,5	-	98,1	1,9	-
37 °C	7,2 mg/ml	59	99,9		0,1	-	-	99,9	-	-
37 °C	4,2 mg/ml	55	99,9		0,1	-	-	99,8	0,2	-
*32 °C	10,0 mg/ml	79	99,9		0,1	-	-	98,7	1,3	-

* Genentech HuIFN- α A-præparat
+ beregnet af formlen

OD 214 af monomermaksimum ved TSK-HPLC (supernatant) X 100

OD 214 af monomerminimum ved TSK-HPLC (udgangsmateriale)

EKSEMPEL 4Sammenligninger af resultater ved reducerende SDS-PAGE

5 Den manglende evne hos SDS-PAGE som gennemført almindeligt til at spore urenhederne bestående af oligomere og langsom monomer skyldes antageligvis, at alle former reduceres (af f. eks. β -mercaptoethanol, der almindeligvis anvendes som reduktionsmiddel) til den samme form - en monomer indeholdende frie sulfhydrylgrupper.

10 Fig. 3 viser resultaterne af SDS-PAGE under reducerende og ikke-reducerende betingelser for Roche Prep og Genentech Prep. Reducerende SDS-PAGE viser i det væsentlige kun båndet svarende til monomer, medens ikke-reducerende SDS-PAGE viser en blanding af komponenter.

EKSEMPEL 5Sammenligning ved gelpermeationschromatografi

15 0,2 ml Roche Prep (4,2 mg/ml) blev anbragt på en søjle med diameter 0,76 cm og længde 27 cm af "Sephacryl S300" ækvilibreret med 50 mM ammoniumacetat, pH 4, og elueret ved en lineær strømningshastighed på 5,2 ml/cm² H.

Elueringsmønstret og resultaterne er vist i fig. 4.

20 Del A viser elueringsmønstret ved anvendelse af optisk tæthed ved 280 nm som mål for protein. Den prikkede kurve repræsenterer interferonaktiviteten og udgør antageligvis hovedsageligt monomert HuIFN- α A (dimeren udviser omkring 15 % af monomerens aktivitet).

Del B viser resultaterne af SDS-PAGE under ikke-reducerende betingelser af de proteinholdige fraktioner i sammenligning med udgangsmaterialet. Det er klart, at separationen ikke er fuldstændig i nogen fraktion, selv om oligomere er koncentreret i de tidligere fraktioner. Endvidere forbliver forholdet mellem langsom og hurtig monomer konstant i alle fraktioner.

Del C viser et TSK-HPLC spor af fraktion 42, som indeholder overvejende monomert HuIFN- α A. Igen er der stadig betydelige mængder oligomere til stede.

Det fremgår således klart af fig. 4, at der slet ikke sker fraskillelse af langsom monomer, og at der er en overlapning mellem monomer- og oligomer-fraktioner, som forhindrer ren adskillelse.

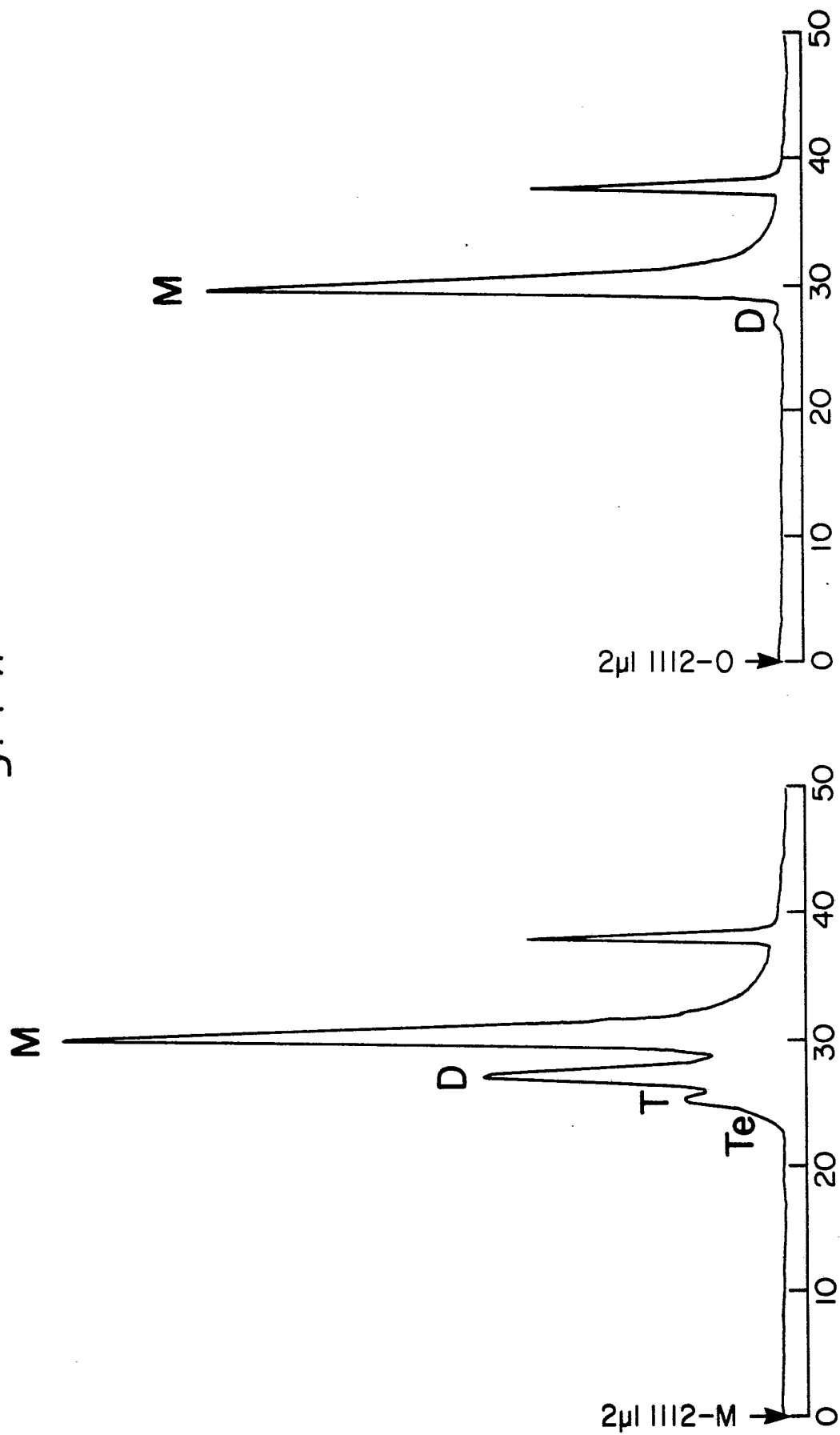
P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fjernelse af oligomere og langsom monomer fra leukocyt-interferoner (IFN- α), der har høj sekvenshomologi med humant leukocyt-interferon, k e n d e t e g n e t ved, at en pufferopløsning indeholdende
5 1 - 20 mg/ml IFN- α ved en pH-værdi mellem 3 og 4,8 inkuberes i fra 30 minutter til 24 timer ved 28 - 40 °C til udfældning af oligomere og langsom monomer, hvorpå nativt IFN- α udvindes fra opløsningen.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien holdes ved 3,5-4,1.
10
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at inkubationsperioden er 10-14 timer.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at inkubationstemperaturen er 30-34 °C.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at koncentrationen af IFN- α er 5-10 mg/ml.
15
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det native IFN- α udvindes ved fjernelse af udfældede oligomere og langsom monomer ved centrifugering.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det anvendte IFN- α er pattedyr-IFN- α .
20
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det anvendte IFN- α er humant IFN- α .

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at det anvendte IFN- α er humant IFN- α A.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at det anvendte IFN- α er okse-IFN- α .

Fig. 1(A).



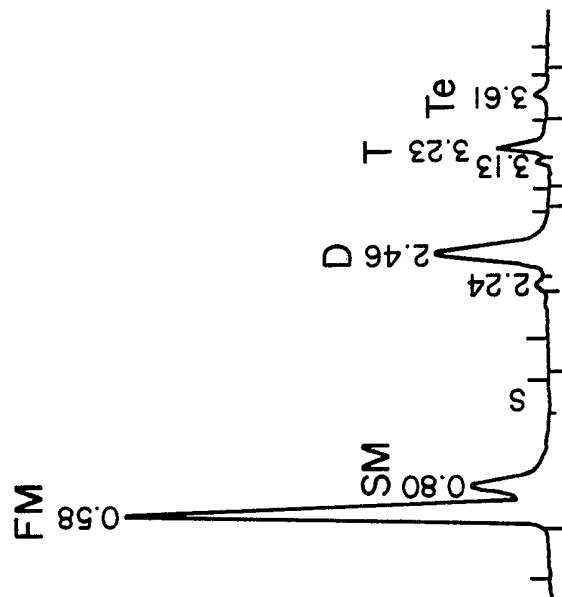
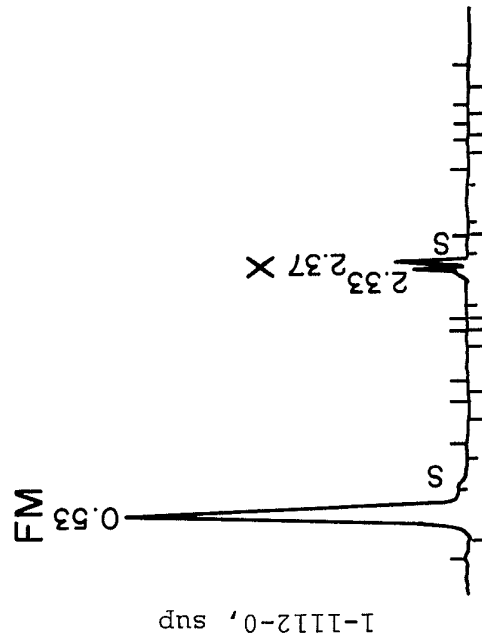


Fig. 1(B).

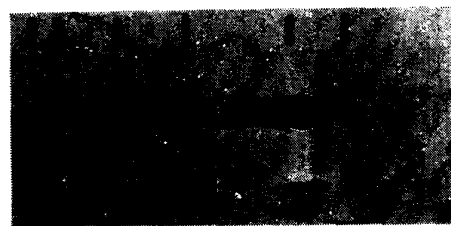


Fig. 1(C).

TSK HPLC						
	M	D (Pct.)	T	Te	FM	SM
					D (Pct.)	T
						Te
11.0	67	24.3	7.4	1.3	54.1	12.9
7.1	98.8	1.2			99.8	0.2
0.9	94.7	5.3			90.3	2.0
					7.5	0.2

Fig. 2(C).

TSK-HPLC						
	M	D (Pct.)	T	Te	FM	SM
					D (Pct.)	T
						Te
0.97	67	24.3	7.4	1.3	54.1	12.9
0.4	>99.9				99.9	0.1
0.04	>99.9				99.9	0.1

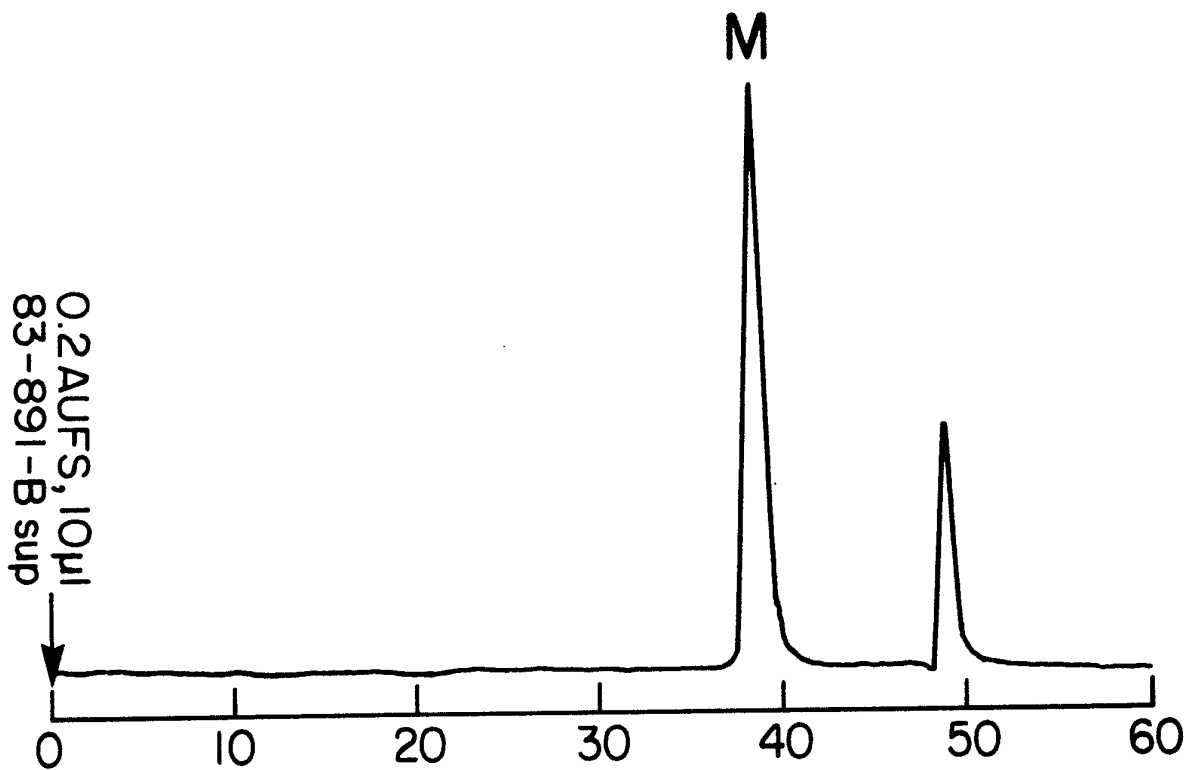
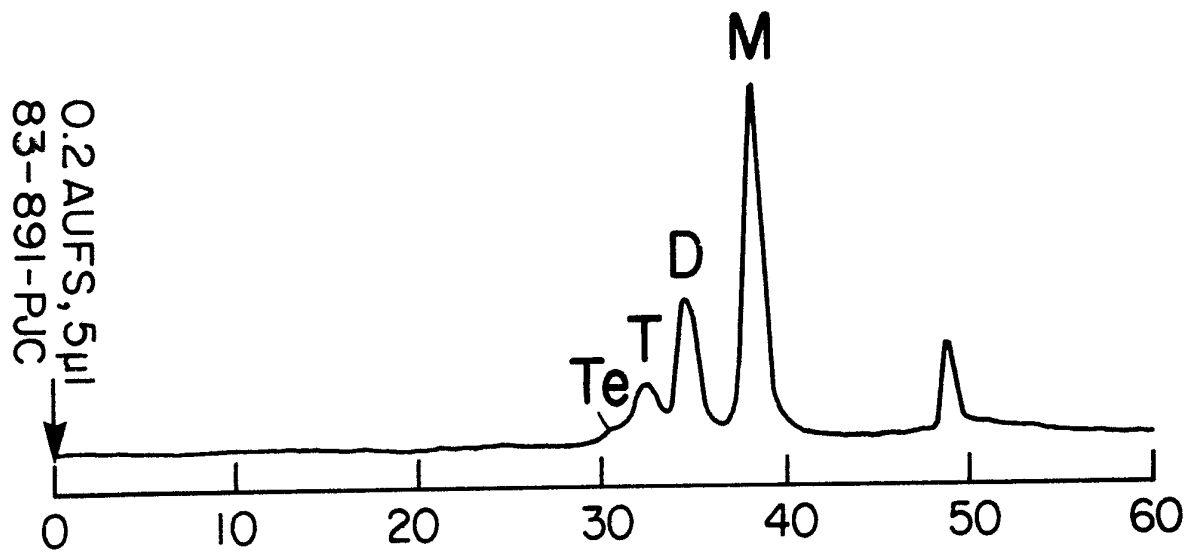
Fig. 2(A).

Fig. 2(B).

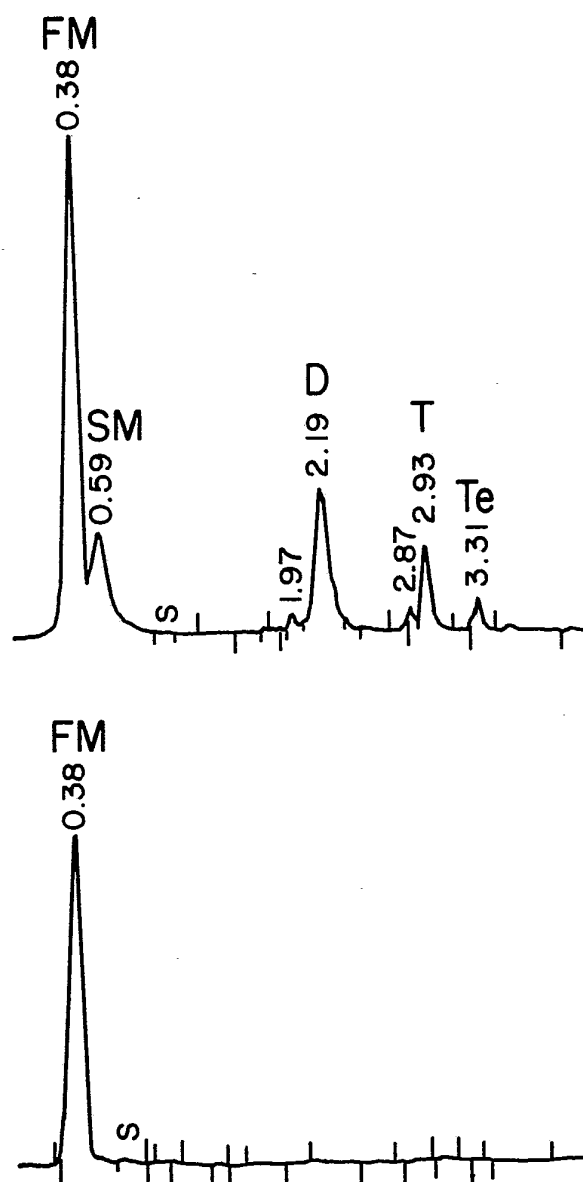


Fig. 3.

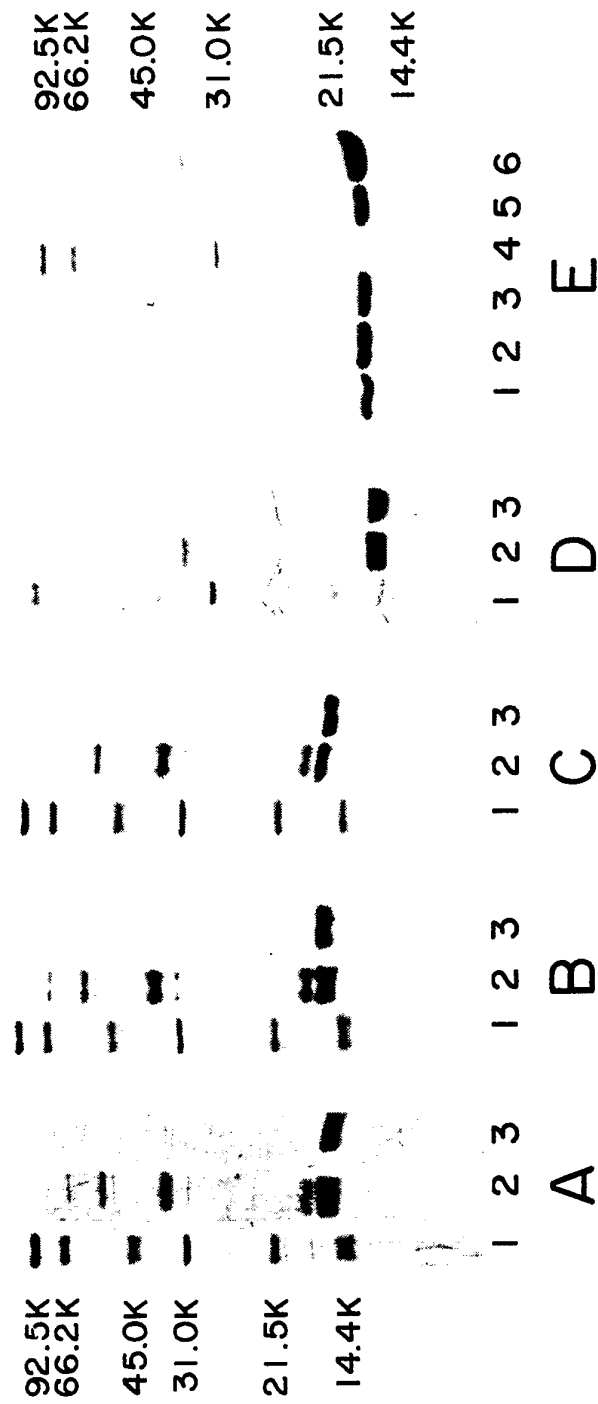


Fig. 4(A).

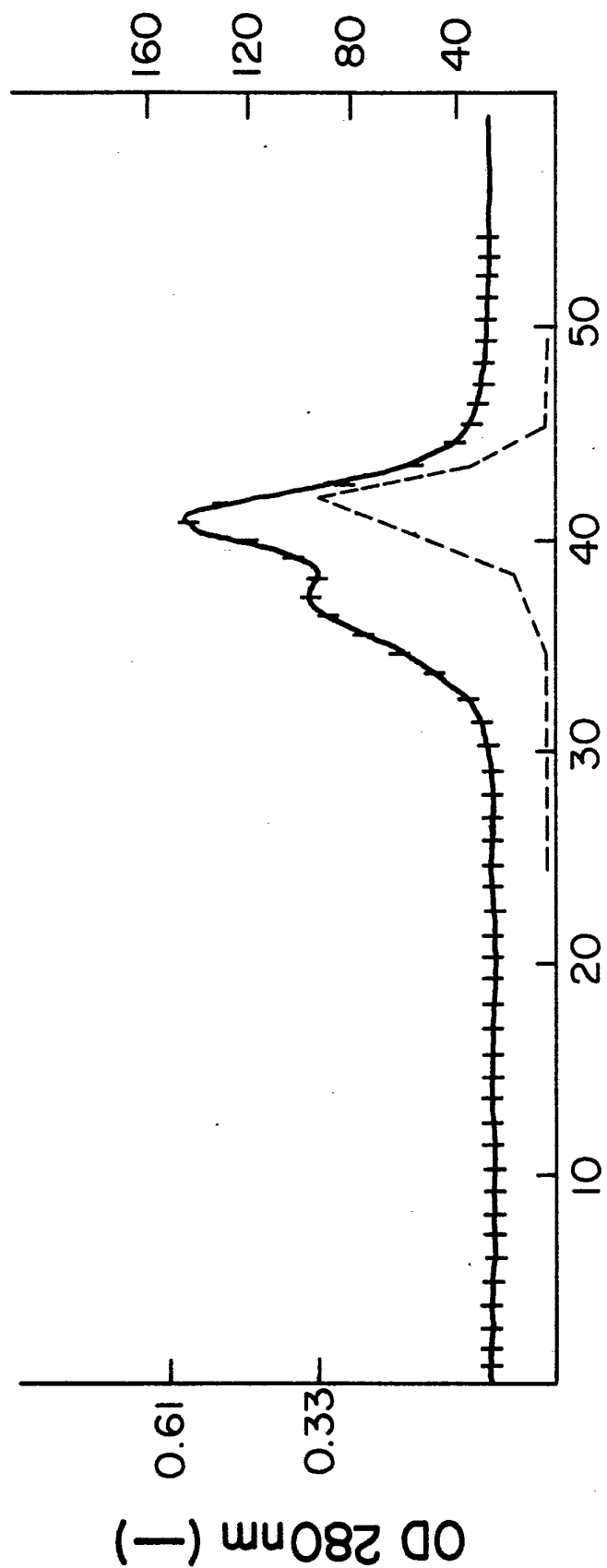


Fig. 4(C).

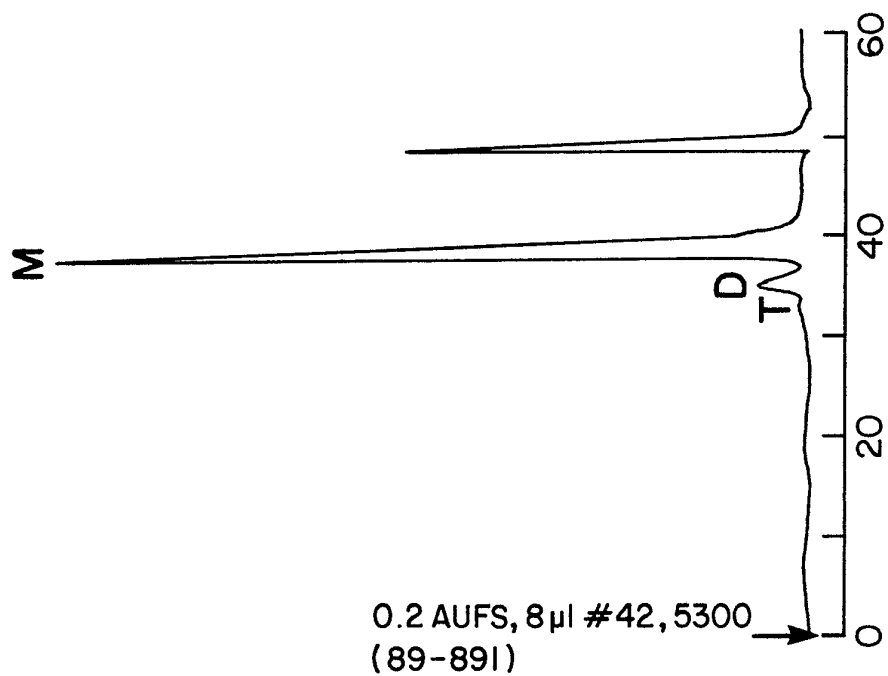


Fig. 4(B).

