



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **331699**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C07K 1/02 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20100775	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2010.05.27	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1999.10.05	(30)	Prioritet	2010.11.12, US, 09/190,542
(41)	Alm.tilgj	2001.05.11			
(45)	Meddelt	2012.02.27			
(62)	Avdelt fra	20012327, med inndato 2001.05.11			
(73)	Innehaver	Schering Corp, 2000 Galloping Hill Road, US-NJ07033-0530 KENILWORTH, USA			
(72)	Oppfinner	Susan Cannon-Carlson, 6 Shady Terrace, US-NJ07470 WAYNE, USA			
		Andres Frei, 75 five Points Road, US-NJ07728 FREEHOLD, USA			
		Seoju Lee, 3506 Hana Road, US-NJ08817 EDISON, USA			
		Roland Mengisen, 40 Randolph Road, US-NJ07728 FREEHOLD, USA			
		Marcio Voloch, Apartment 7R, 600 Columbus Avenue, US-NY10024 NEW YORK, USA			
		David C Wylie, 9 Heahermeade Place, US-NJ07016 CRANFORD, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for økning av utbyttet av et interferon alfa-preparat
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0553494 A1
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for økning av utbyttet av et interferon alfa-preparat, som omfatter omdannelse av en pyruvatsupplementisoform av interferon alfa til interferon alfa, hvor supplementisoformen eksponeres for sinkløsninger som eventuelt omfatter en antioksidant.

Område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for økning av utbyttet av et interferon alfa-preparat.

Bakgrunn

5 Naturlig forekommende proteiner er vidt anvendt for forskning og kliniske formål. Selv om slike proteiner kan erholdes fra deres naturlige kilde, kan rekombinante teknikker muliggjøre produksjon av disse proteiner fra ikke-naturlige kilder. Eksempelvis gir fermentering av mikroorganismer konstruert via rekombinant teknologi, slik som transformerte bakterier, store mengder humant interferon til en
10 betydelig lavere pris enn hva som er mulig under anvendelse av naturlige kilder. Slike rekombinante DNA-teknikker er også blitt anvendt for å produsere andre viktige proteiner slik som insulin og vevsplasminogenaktivator.

Fra EP 0553494 er det kjent å refolde interferon alfa ved å anvende cystein og cystin.

15 Bakterier forandret ved rekombinante teknikker, produserer imidlertid også forurensninger og strukturelle isoformer av det protein som er beregnet på å bli produsert. Disse forurensninger og isoformer innbefatter oligomere proteiner og reduserte proteinisoformer (se US patentskrift nr. 4 765 903), cellerester og virus (se US patentskrift nr. 4 732 683) og pyruvatkjededc isoformer (se Rose et al., J. Biol.
20 Chem. 287:19101 (1992); Prome et al., J. Biol. Chem. 266:13050 (1991); Stevens et al., J. Biol. Chem. 252:2998 (1977); og Shapiro et al., J. Biol. Chem. 255:3120 (1980)). Det er ønskelig å fjerne disse forurensninger under rensing av proteinet.

Selvsagt reduserer disse proteinisoformer renheten av det ønskede protein, og fremgangsmåter for fjerning av isoformene reduserer det totale utbytte. Hvis imidlertid
25 proteinisoformene kan omdannes til det ønskede protein, er deres fjerning unødvendig, og det totale proteinutbytte vil bli signifikant forøkt. Hva som trengs, er en måte for å kunne identifisere uønskede proteinisoformer og omdanne disse til det ønskede protein. Foreliggende oppfinnelse dreier seg om slike behov.

Oppsummering av oppfinnelsen

30 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for økning av utbyttet av et interferon alfa-preparat. Fremgangsmåten er kjennetegnet ved at en pyruvatsupplementisoform av interferon alfa omdannes til interferon alfa ved eksponering av pyruvatsupplementisoformen av interferon alfa overfor en sinkløsning.

Selv om den foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset til et bestemt
35 interferon alfa, er interferon alfa i en foretrukket utførelsesform interferon alfa-2b.

I foretrukne utførelsesformer omfatter sinkløsningen en antioksidant. I særlig foretrukne utførelsesformer omfatter antioksidanten metionin. I en slik utførelsesform er den foretrukne konsentrasjon av metionin 5-40 mM.

Definisjoner

5 Som anvendt her, betyr uttrykket "supplementisoform" en proteinisoform som har strukturelle og/eller funksjonelle karakteristika lik et ønsket protein, hvori en spaltbar gruppe kan fjernes fra proteinet for å gi det ønskede protein. En "spaltbar gruppe" skal forstås å bety en kjemisk gruppe bundet til et ønsket protein som kan fjernes kjemisk. "Kjemisk fjerning" eller "fjernes kjemisk" som anvendt her, skal
10 forstås å angi at en kjemisk gruppe er blitt separert fra et protein på kjemisk måte, innbefattende syreløsning, basisk løsning eller metallionkatalyse.

Hvis den spaltbare gruppe kan identifiseres kjemisk, kan supplementisoforment refereres til som en spesifikk type supplementisoform. Eksempelvis er en "pyruvat-supplementisoform" et ønsket protein som har en spaltbar gruppe bundet dertil som er
15 identifiserbar som pyruvat.

Som anvendt her, refererer uttrykket "interferon alfa" til en familie av fremkallbare utskilte proteiner som tilveiebringer motstand overfor virus på målceller, inhiberer celleprolifisering og regulerer ekspresjon av MHC klasse I-antigener. Denne familie innbefatter, men er ikke begrenset til, interferon alfa-2a ("Roferon", Hoffman La-
20 Roche, Nutley, NJ), interferon alfa-2b ("Intron", Schering-Plough, Madison, NJ), interferon alfa-2c ("Berofer Alpha", Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Tyskland) eller konsensusinterferon som definert ved bestemmelse av en konsensussekvens av naturlig forekommende interferon alfaer ("Infergen", Amgen, Thousand Oaks, CA).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

25 Foreliggende oppfinnelse angår isolering og rensing av proteiner, og det beskrives identifisering og rensing av supplementisoformer. Den foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåter for fremstilling av et ønsket protein fra supplementisoformer. Med foreliggende oppfinnelse tilveiebringes et høyrenset, ønsket protein ved korensing av det ønskede protein sammen med supplementisoformer og etter-
30 følgende omdannelse av supplementisoformene til det ønskede protein. På denne måten reduseres mengden av supplementisoform, og det totale utbytte av det ønskede protein økes og/eller er mer høyrenset enn hva som tidligere kunne oppnås. Utbyttet av det ønskede protein kan økes så mye som ti ganger utbyttet som erholdt uten omdannelse av supplementisoformer.

35 Selv om foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset av kilden til det ønskede protein eller supplementisoformene, er kilden, i én utførelsesform, mikroorganismer konstruert via rekombinante teknikker. Det er mange slike teknikker kjent innen faget.

Slike transformerte mikroorganismer kan være eukaryotiske eller prokaryotiske celler, bakterier, pattedyrceller, etc. Eksempelvis kan interferon alfa produseres i bakterier ved å følge læren i US patentskrift 4 530 901, eller ved teknikkene beskrevet i europeisk patentsøknad, publikasjonsnr. EP032 134.

5 Likeledes er foreliggende oppfinnelse ikke begrenset til noen spesiell metode for ekstrahering av pyruvatsupplementisoformen fra den produserende celle. Når det ønskede protein er interferon alfa, er f.eks. metodene beskrevet i US patentskrifter nr. 4 315 852 og 4 364 863, egnet.

10 Likeledes er foreliggende oppfinnelse ikke begrenset av de spesielle rense-teknikker som anvendes for å isolere supplementisoformen fra det ønskede protein. Mange kromatografi- og andre separeringsteknikker er kjent innen faget og er anvendbare her.

Selv om foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset ved metoden for identifisering av supplementisoformen, kan identifisering av supplementisoformer utføres ved studering av molekylvekten av det ønskede protein og enhver forurensning som har en 15 molekylvekt høyere enn det ønskede protein. Én slik metode er beskrevet i Rose et al., J. Biol. Chem. 267:19101 (1992). Forurensninger som har en molekylvekt høyere enn det ønskede protein, kan eksponeres overfor degraderingsbetingelser (f.eks. ekstremt sur eller ekstremt basisk pH) og analyseres med hensyn til nedbrytningsprodukter. Hvis ett 20 av disse nedbrytningsprodukter har den samme masse og/eller de strukturelle karakteristika som det ønskede protein, kan forurensningen betraktes som en supplementisoform som har en spaltbar gruppe.

Foreliggende oppfinnelse er heller ikke begrenset av temperaturen ved hvilken spaltningsreaksjonen utføres. Jo høyere temperaturen er, jo hurtigere vil imidlertid 25 supplementisoformen bli omdannet til det ønskede protein.

Selv om kjemisk fjerning av en spaltbar gruppe kan produsere et protein med samme strukturelle karakteristika som det ønskede protein, er det enkelte ganger nødvendig å oksidere reduserte sulfhydrylgrupper til disulfidbindinger. Dette muliggjør at proteinet antar riktig folding og blir et funksjonelt protein. Metoder for oksidering av 30 sulfhydrylgrupper er kjent innen faget, og foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset ved noen bestemt oksidasjonsmetode.

I én utførelsesform tar foreliggende oppfinnelse i betraktning beskyttelse av metioningrupper under oksidasjon for å forhindre dannelse av metioninsulfoksid. Metoder for beskyttelse av metioningrupper er kjent innen faget, og foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset av bestemte metoder for beskyttelse av metioningrupper. 35 Metoder innbefatter imidlertid anvendelse av antioksidanter som beskrevet av Lam et al., J. Pharm. Sci. 86:1250 (1997) og US patentskrift nr. 5 272 135.

Foreliggende oppfinnelse er heller ikke begrenset av metoden for implementering av en oksidasjonsreaksjon. I én utførelsesform tar f.eks. foreliggende oppfinnelse

i betraktning fjerning av en spaltbar gruppe etterfulgt av oksidasjon av sulfhydryl-grupper. I en annen utførelsesform tar foreliggende oppfinnelse i betraktning fjerning av spaltbare grupper og oksidering av sulfhydrylgrupper under de samme reaksjons-betingelser.

- 5 Når den kjemiske fjerning av den spaltbare gruppe og oksidasjon av proteinet utføres i samme reaksjon, er foreliggende oppfinnelse likeledes ikke begrenset ved noen bestemt metode for fjerning av spaltbare grupper fra en supplementisform og oksidering. I én utførelsesform utføres imidlertid en screeningsprosess for å bestemme de beste betingelser for kjemisk fjerning av den spaltbare gruppe. Eksempelvis kan
- 10 forsøk under anvendelse av et område av pH-betingelser foretas, og mengden av resulterende ønsket protein med riktig strukturell integritet (dvs. ikke irreversibelt denaturert) og/eller mengden av spaltbar gruppe kan måles. En nedtegning av mengden av ønsket protein som har riktig strukturell integritet mot reaksjons-pH, vil generelt resultere i en klokkekurve hvor det høyeste punktet av kurven representerer den ideelle
- 15 pH for kjemisk fjerning av den spaltbare gruppe. I en slik utførelsesform kan en lignende screening foretas for oksidasjonsreaksjonen. Hvis klokkekurvene for den kjemiske fjerningsreaksjon og oksidasjonsreaksjonen krysser hverandre, angir krysningspunktet de beste pH-betingelser for fjerning av den spaltbare gruppe og oksidering av hydroksylgruppene i samme reaksjon. For kjemisk fjerning og
- 20 oksidasjon av en pyruvatsupplementisform av interferon alfa, krysser de to kurver rundt pH 5, hvilket angir den beste pH ved hvilken en kombinasjonsreaksjon skal utføres. Andre reaksjonsbetingelser som kan evalueres innbefatter saltkonsentrasjon, temperatur, etc.

- Etter omdannelse av supplementisformen til det ønskede protein kan ytterligere
- 25 kromatografitrinn være nødvendig for å rense de ønskede proteiner fra forurensninger.

- Etter at det ønskede protein er hensiktsmessig renset, kan det anbringes i en form egnet for terapeutisk bruk om ønsket. Når det ønskede protein er interferon alfa, er f.eks. formuleringene beskrevet i US patentskrifter nr. 4 847 079, 4 496 537 og 5 766 582, egnet. Alternativt kan andre inerte, farmasøytisk akseptable bærere enten
- 30 være faste eller væskeformige. Preparater i fast form innbefatter pulvere, tabletter, dispergerbare granuler, kapsler, pulverkapsler og stikkpiller. Pulverne og tablettene kan være omfattet av fra ca. 5 til ca. 95 % ønsket protein. Egnede faste bærere er kjent innen faget, f.eks. magnesiumkarbonat, magnesiumstearat, talkum, sukker eller laktose. Tabletter, pulvere, pulverkapsler og kapsler kan anvendes som faste doseringsformer
- 35 egnet for oral administrering.

For fremstilling av stikkpiller smeltes først et lavtsmeltende voks, slik som en blanding av fettsyreglyserider (f.eks. kakaosmør), og den aktive bestanddel dispergeres homogent deri ved omrøring. Den smeltede, homogene blanding helles deretter over i støpeformer av egnet størrelse, tillates å avkjøles og derved stivne.

Væskeformige preparater innbefatter løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempelvis kan vann eller vann-propylen glykolløsninger for parenteral injeksjon anvendes, eller tilsetning av søtningsmidler og blakkgjøringsmidler for orale løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Væskeformige preparater kan også innbefatte løsninger
5 for intranasal administrering.

Aerosolpreparater egnet for inhalering, kan innbefatte løsninger og faste materialer i pulverform som kan være i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer slik som en inert, komprimert gass.

Interferon alfa-preparatet fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan
10 også avgis transdermalt. De transdermale preparater kan anta form av kremer, lotions, aerosoler og/eller emulsjoner og kan være innbefattet i et transdermalt plaster av matriks- eller reservoartypen som hensiktsmessig innen faget for dette formål.

Mengden av aktiv forbindelse i en enhetsdose av preparat kan justeres fra ca. 0,01 mg til ca. 1 000 mg, og fortrinnsvis fra ca. 0.01 mg til ca. 750 mg. Alternativt kan
15 den aktive forbindelse fremstilles ved internasjonale enheter hvor de foretrukne doser er mellom 3 millioner og 50 millioner internasjonale enheter. I en slik utførelsesform er 3 millioner, 5 millioner, 18 millioner, 25 millioner og 50 millioner enhetsdoser tatt i betraktning.

Det kan også fremstilles faste former som er beregnet på å bli omdannet, kort
20 før bruk, til væskeformige preparater for enten oral, topisk eller parenteral administrering.

De etterfølgende eksempler tjener til å illustrere visse foretrukne utførelsesformer og aspekter ved foreliggende oppfinnelse.

25 **Eksempel 1: Screeningsprosess for omdannelse av pyruvatsupplementisoformer**

Pyruvatsupplementisoformer kan dannes på innsiden av celler, hvori alfa-aminogruppen av den N-terminale aminosyrerest av et protein kondenseres med karbonylgruppen av pyruvat. Hvis pyruvatet interfererer med proteinstrukturen, er det bare når en slik pyruvat-proteinsupplementisoform hydrolyseres (pyruvat spaltes fra et
30 protein) at proteinet fritt kan foldes igjen i dets ønskede form via termodynamisk fordelaktig strukturforandring. Hvis et ønsket protein har disulfidbindinger, skal en redusert isoform resulterende fra pyruvatspaltningen, oksideres som en del av refoldingen inn i den ønskede form.

Den etterfølgende prosedyre illustrerer hvordan de optimale betingelser kan
35 bestemmes for å omdanne pyruvat-proteinsupplementisoform over i dens ønskede form. Hvis et ønsket protein ikke har disulfidbindinger, må, som diskutert tidligere, screening utføres for enkelt å maksimere pyruvatspaltningen (hydrolyse). Hvis et ønsket protein har disulfidbindinger, må screening utføres for å maksimere ikke bare pyruvatspaltning (hydrolyse), men også disulfidbindingsdannelse (oksidasjon).

1) Pyruvatutprøvning:

En pyruvatutprøvning er nødvendig for å overvåke graden av hydrolyse for å forstå pyruvat-spaltningsskinetikken. Eksempelvis kan "fritt" pyruvat kvantitativt bestemmes ved en kjemisk modifiseringsmetode eller en enzymatisk metode. 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) kan anvendes for å derivatisere pyruvat. En forsøksprøve skal ultrafiltreres for å eliminere en pyruvat-proteinsupplementisofrom under anvendelse av en korrekt MWCO-membran, f.eks. en 10K-membran. Et filtrat inkuberes ved sur pH med DNPH som reagerer med "fritt" pyruvat. DNPH-derivatisert pyruvat, 2,4-dinitrofenylhydrazon, kan lett analyseres på RP-HPLC under anvendelse av en C8-kolonne slik som en "Nucleosil C8"- (5 µm) kolonne.

Da derivatiseringsreaksjonen er støkiometrisk, er en kvantitativ måling av pyruvat også mulig. Et enzymsett (f.eks. laktatdehydrogenase/NADH) kan også anvendes for å måle pyruvat. Denne metode krever ikke prøveultrafiltrering da dens milde betingelser ikke spalter pyruvat fra en pyruvat-proteinsupplementisofrom under inkubering.

For å måle den kombinerte mengde fritt pyruvat og pyruvat bundet til et protein, skal alt bundet pyruvat spaltes fra før derivatiseringen. Da DNPH-derivatiseringsmetoden krever meget sur pH og relativt lang inkuberingstid, kan pyruvat spaltes fra og deretter derivatiseres med DNPH under inkuberingen. En prøve skal derfor anvendes uten å bli ultrafiltrert i DNPH-derivatiseringsmetoden for å måle en kombinert mengde av fritt og bundet pyruvat i prøven.

2) Isoformbestemmelse:

Minst tre isoformer eksisterer for proteiner med disulfidbindinger, og to isoformer eksisterer for proteiner uten disulfidbindinger. Generelt angitt, kan et ønsket protein og dets reduserte form lett oppløses med RP-HPLC.

I tilfellet av et protein med disulfidbindinger vil screening være meget effektivt hvis tre isoformer (supplementisofrom, redusert og ønsket protein) kan analyseres kvantitativt på RP-HPLC. Det vil ikke være noe absolutt behov for pyruvatbestemmelsen, og det er mulig å identifisere hvilket trinn som er hastighetsbegrensende hvis slikt er tilfelle. Imidlertid er det vanligvis vanskelig å oppløse en pyruvat-protein-supplementisofrom fra en redusert form. I dette tilfelle er en pyruvatbestemmelse nødvendig for å optimalisere hvert omdannelsestrinn.

3) Måling av isoformsammensetning:

Når en ønsket form ikke har disulfidbindinger, kan isoformsammensetningen bestemmes uten vanskelighet da en pyruvat-proteinsupplementisofrom lett kan oppløses fra en ønsket form på RP-HPLC.

Når den ønskede form har disulfidbindinger og en proteinsupplementisofrom ikke er separerbar fra dens reduserte form, skal et pyruvat bundet til et protein, måles for å bestemme isoformsammensetningen. Den molare mengde pyruvat bundet til et protein, som er mengden av en protcinsupplementisofrom, er den kombinerte mengde
 5 fritt og bundet pyruvat $\div$ mengden av fritt pyruvat. Dette kan måles under anvendelse av en prøve med og uten ultrafiltrering i DNPH-metoden. Mengden av en redusert form er da forskjellen mellom den kombinerte mengde av en proteinsupplementisofrom og en redusert form målt med RP-HPLC og mengden av pyruvat bundet til et protein bestemt med en pyruvatbestemmelse. Isoformsammensetningen kan deretter beregnes.

10

4) Screening av optimale betingelser:

Hvorvidt en ønsket form har disulfidbindinger eller ikke, skal screeningskriteriene være de samme for å maksimere den spesifikke omdannelsesgrad av supplementisofromen til en ønsket form.

15

4.1) Når et ønsket protein ikke har noen disulfidbinding:

I dette tilfelle spaltes en ønsket protcinform som pyruvat fra en pyruvat-protein-supplementisofrom. Pyruvatspaltning behøver ikke å overvåkes ved pyruvatbestemmelse i dette tilfelle, da det er bare ett trinn, hydrolyse, som er involvert i omdannelsen
 20 av supplementisofromen til en ønsket form. Overvåkning både av forsvinningen av supplementisofromen og dannelse av en ønsket form på RP-HPLC er f.eks. tilstrekkelig. Inkuberingsbetingelser for å maksimere omdannelsen av en supplementisofrom til et ønsket protein må finnes.

Det første trinn er å undersøke reaksjonskinetikken med hensyn til et arbeids-
 25 område for den proteinsupplementisofromkonsentrasjon som skal anvendes i screeningen. Hvis kinetikken er av første orden med hensyn til supplementisofromkonsentrasjonen, har prøvekonsentrasjonen ingen innflytelse på kinetikken, og enhver konsentrasjon kan anvendes under screeningen eller parameterevalueringen. Ellers bør konsentrasjonen holdes konstant under screeningen.

30

Det kan være mange parametre som påvirker hydrolysetrinnet. Hovedparametrene kan være pH, temperatur, metallioner (slik som sink, jern(III), jern(II), Cu, Mg. etc.), ledningsevne, buffere, lys og omrøring. Ved måling av effekten av en inkuberingsparameter på omdannelsen av en supplementisofrom til en ønsket form kan hver parameter optimaliseres. Eksempelvis inkuberes flere alikvoter av en prøve
 35 inneholdende en pyruvat-proteinsupplementisofrom ved et tilstrekkelig område av forskjellige pH-verdier, hvor alle de andre parametre holdes ved deres respektive best anslåtte verdier. Omdannelsesreaksjonen i hver alikvot måles etter en bestemt inkuberingsperiode (f.eks. over natten. Den pH ved hvilken den høyeste omdannelse erholdes, bestemmes som den optimale pH. Et slikt forsøk gjentas for å optimalisere

andre parametre med optimale verdier av de optimaliserte parametere anvendt istedenfor deres tidligere best antatte verdier. Dette er en typisk optimaliseringsteknikk.

Inkuberings-pH påvirker hydrolysegraden. Generelt fører lavere pH til mer hydrolyse. Høyere temperatur øker også hydrolyse. Hydrolyse ved en meget sur pH, slik som pH 2, kan imidlertid ikke fungere når det er en irreversibel utfelling av en supplementisoform eller et ønsket protein, eller hvis proteinet denatureres irreversibelt. Nærvær av enkelte metallkationer kan katalysere hydrolysen. Selv om et metallkation katalyserer pyruvatspaltningen, kan en slik katalyse være sterkt metallkationkonsentrasjonsavhengig. Et meget bredt område av metallionkonsentrasjon skal derfor anvendes når metallkationer screenes.

Det kan også være interaksjoner blant parametrene. Det kan f.eks. være mulig at det er forskjellig optimal pH avhengig av hvorvidt et metallion er til stede eller ikke når et slikt kation har en innflytelse på omdannelsen. Når det gjelder en pyruvat-supplementisoform, resulterer nærvær av Zn-kation i en forskjellig optimal pH for pyruvatspaltning (pH 7,8-8,6). Det er derfor nødvendig å variere samtidig ikke bare en ny parameter som skal optimaliseres, men også andre viktige parametre for virkelig å optimalisere denne.

4.2) Når et ønsket protein har disulfidbindinger:

I en to-trinnsomdannelsesprosess spaltes en redusert form fra supplementisoformen via hydrolyse og omdannes deretter til en ønsket form via oksidasjon.

Ideelt sett isoleres en proteinsupplementisoform og en redusert form, og prosedyren som er beskrevet ovenfor for tilfellet av et protein uten disulfidbindinger, anvendes på hver av supplementisoformen og den reduserte form for å optimalisere hvert trinn. En hovedforskjell er at oksygenoverføring og enkelte oksidanter slik som oksidert glutation (GS-SG) i tillegg til parametrene angitt ovenfor, kan optimaliseres for oksidasjonstrinnet. Hvis GS-SG oksiderer bare en redusert form, vil den sterkt øke oksidasjonen av disulfidbindingsdannelsestrinnet. Imidlertid vil det sannsynligvis være et lavt utbytte eller omdannelse hvis GS-SG også oksiderer supplementisoformen og den oksiderte supplementisoform ikke lett hydrolyseres.

Fra hver optimal tilstand kan de optimale betingelser for omdannelsen av supplementisoformen til en ønsket form bestemmes. Hvis de er rimelig nær, innstilles de intermediære tilstander som optimale tilstander. Teoretisk angitt, kan det være forskjellige optimale tilstander avhengig av begynnelsesforholdet mellom pyruvat-proteinsupplementisoformen og en redusert form i en prøve. Eksempelvis skal de optimale tilstander være forskjellige når supplementisoformen utgjør den absolutte majoritet, når en redusert form er i absolutt majoritet. Det skal derfor tas i betraktning at prøvesammensetningen skal tas hensyn til når de optimale tilstander bestemmes fra de individuelle optimale tilstander for hydrolysen og oksidasjonen.

Sluttelig bekreftes de optimale tilstander for omdannelsen eksperimentelt. Det er ofte nyttig å fininnstille de optimale betingelser for omdannelsen for å identifisere et hastighetsbegrensende trinn hvis slikt eksisterer. Den stabile akkumulering av redusert form med inkuberingstiden indikerer at oksidasjonstrinnet er hastighetsbegrensende.

- 5 Når akkumulering skjer, skal betingelser som er mer fordelaktige for oksidasjonen, slik som mer oksygen, høyere pH og høyere temperatur, anvendes for å maksimere dannelsen av den ønskede form. Hvis det alltid er et lavt nivå av redusert protein, men signifikant dannelsesgrad av en ønsket form, er spaltningstrinnet hastighetsbegrensende. Når dette skjer, kan inkuberingsbetingelsene forandres slik at de kan forbedre spaltningstrinnet, som vil lede til maksimering av dannelsen av den ønskede form.

Hvis de optimale betingelser for kjemisk fjerning av en spaltbar gruppe og oksidasjon av proteinet er meget langt fra hverandre, kan de utføres trinnvis. Eksempelvis utføres de optimale betingelser for hydrolysetrinnet først, og de optimale betingelser for oksidasjonstrinnet anvendes når hydrolysen er praktisk talt fullført.

- 15 Når det ikke er enkelt å isolere hver isoform, blir pyruvatbestemmelsen nødvendig, spesielt når de to isoformer ikke kan oppløses på RP-HPLC. Ved overvåkning av pyruvatfrigivelse kan hydrolysetrinnet først optimaliseres. Det andre trinn optimaliseres når det første trinn er praktisk talt over eller meget langsomt. Fra disse optimale betingelser bestemmes de totale optimale omdannelsesbetingelser og bekreftes eksperimentelt. En alternativ løsning er at den totale omdannelse optimaliseres etter at hydrolysetrinnet er optimalisert. Denne løsning kan være mer praktisk når det er vanskelig å optimalisere det andre trinn på grunn av interferens forårsaket av signifikant og kontinuerlig supplementisohydrolyse. Som nevnt tidligere, er pH, temperatur, oksygenoverføring, metallkationer og oksidanter viktige parametre som må optimaliseres.

Interaksjoner mellom parametrene blir mer viktige for to-trinnsomdannelsesprosessen enn de er for en-trinnsomdannelsesprosessen.

- For å bekrefte at det ikke er noen innvirkning av slike optimale tilstandsparametre på en ønsket form, skal en ønsket form renses, og dens egenskaper, innbefattende biologisk spesifikk aktivitet og renhet, skal full ut kontrolleres.

Eksempel 2: Omdannelse av pyruvatsupplementisohydrolyse til interferon alfa2b

- Spaltningen av pyruvat og dannelsen av disulfidbindingene ble utført ved forhøyet temperatur (30-37 °C) og en reaksjons-pH på 5,2-5,6. Disse reaksjonsbetingelser er unike ved at begge reaksjoner finner sted sekvensvis under de samme reaksjonsbetingelser, og at bioaktivt protein gjenvinnes.

Fraksjonene inneholdende toppen av protein UV-absorbans som eluerte fra proteinisoleringskromatografien, ble samlet sammen og sterilitetsfiltrert ved 0,45 µM.

3 g metionin pr. liter proteinansamling ble tilsatt til proteinansamlingen og omrørt inntil oppløsning. pH på ansamlingen ble justert til 5,2-5,6 med fortynnet natriumhydroksid. Natriumkloridkonsentrasjonen ble ikke justert: den var mellom 150-200 mM NaCl.

- 5 En lagerløsning med pH 5,5 bestående av 10 mM acetat, 200 mM metionin og 200 mM NaCl, ble tilsatt til proteinansamlingen til en sluttkonsentrasjon på 20 mM metionin.

Proteinansamlingen ble overført til et reaksjonskar og temperaturen ble hevet til 37 °C med jevn omrøring. Proteinansamlingen ble inkubert ved 36-38 °C i 24-30
10 timer.

Ved 24-30-timerstidspunktet ble reaksjonsblandingen filtrert gjennom et dypfilter etterfulgt av et 0,45 µM filter for å fjerne utfellingen. Ansamlingen ble deretter konsentrert og diafiltrert mot 10 mM acetat, pH 5,5, ved 2-10 °C.

15 **Eksempel 3: Omdannelse av pyruvatsupplementisoform til interferon alfa2b under anvendelse av sink**

Pyruvatsupplementisoform ble omdannet til interferon alfa2b ved 34 °C og pH 8,2 med sink (1 M). Reaksjonsløsningen ble omrørt under reaksjonen. Når omdannelsen var ca. 80%, kan reaksjonstemperaturen på løsningen reduseres til 4 °C
20 for å stoppe reaksjonen.

Løsningsfremstilling: 1 M tris-buffer: holdt ved 4 °C, 1 M tris-base + HCl ved pH 8,3. 1 mM Zn-løsning: holdt ved 4 °C, 1 mM ZnSO₄H₂O + 10 mM Na-acetat + 175 mM NaCl ved pH 5,5.

Fraksjonene inneholdende toppen av UV-absorbans som eluerte fra
25 proteinrenningskromatografien, ble samlet sammen og sterilitetsfiltrert ved 0,2 µM. Ca. 0,083 (V/V) av 1 M tris-bufferen ble langsomt tilsatt til proteinansamlingen (pH på en typisk proteinansamling er i området på 5,2 til 5,5) som ble omrørt ved en pH på ca. 8,2.

1 mM Zn-løsningen ble langsomt tilsatt til den basiske proteinansamling under
30 omrøring for å oppnå et 0,6 til 1,0 molarforhold av Zn-kation til total pyruvatsupplementisoform, f.eks. hvis en pyruvatsupplementisoformkonsentrasjon er 1,0 mg/ml, er 30 µM av Zn eller 0,03 (V/V) av 1 mM Zn-løsningen nødvendig. Det anvendes frisk Zn-kationløsning.

Reaksjonsløsningen ble oppvarmet til 34 °C i en reaktor mens den ble omrørt.
35 Reaksjonstemperaturen ble kontrollert ved 34 °C under reaksjonen. Kontinuerlig omrøring er også nødvendig i den grad at blandingen i reaksjonsløsningen er tilstrekkelig, men ikke kraftig nok til å danne bobler. En viss ventilasjon i reaktoren skal tillates for oksygenoverføring inn i reaksjonsløsningen. Hvis på den annen side reaktoren er ca. halvfull av reaksjonsløsning, er en slik ventilasjon ikke nødvendig.

Under reaksjonen kan en reaksjonsprøve tas for å følge omdannelsen under anvendelse av RP-HPLC. Når reaksjonen er over, kan temperaturen reduseres til 4 °C for neste kromatografitrinn.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Fremgangsmåte for økning av utbyttet av et interferon alfa-preparat.
k a r a k t e r i s e r t v e d a t e n p y r u v a t s u p p l e m e n t i s o f o r m a v i n t e r f e r o n a l f a
o m d a n n e s t i l i n t e r f e r o n a l f a v e d e k s p o n e r i n g a v a n g i t t e p y r u v a t s u p p l e m e n t i s o f o r m a v
i n t e r f e r o n a l f a o v e r f o r s i n k l ø s n i n g.
- 10 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e i n t e r f e r o n a l f a e r i n t e r f e r o n a l f a 2 b.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e s i n k l ø s n i n g e r v e d p H 7,8 t i l p H 8,6.
- 15 4. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e s i n k l ø s n i n g e r v e d 30-38 °C.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e s i n k l ø s n i n g o m f a t t e r e n a n t i o k s i d a n t.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e a n t i o k s i d a n t o m f a t t e r m e t i o n i n.
- 25 7. Fremgangsmåte ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e m e t i o n i n e r v e d e n k o n s e n t r a s j o n p å 5-40 mM.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n v i d e r e o m f a t t e r r e n s i n g e n a v a n g i t t e i n t e r f e r o n
30 a l f a 2 b v e d å a n v e n d e k r o m a t o g r a f i.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n g i t t e k r o m a t o g r a f i o m f a t t e r a g a r o s e b a s e r t f a r g e s t o f f -
a f f i n i t e t s k r o m a t o g r a f i e t t e r f ø l g t a v a g a r o s e b a s e r t a n i o n b y t t e r k r o m a t o g r a f i, s o m e t t e r -
35 f ø l g e s a v e t k r y s t a l l i s a s j o n s t r i n n.