



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324529**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19970514	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.06.05 PCT/US96/09155
(22)	Inng.dag	1997.02.05	(85)	Videreføringsdag	1997.02.05
(24)	Løpedag	1996.06.05	(30)	Prioritet	1995.06.06, US, 477310
(41)	Alm.tilgj	1997.03.17			
(45)	Meddelt	2007.11.12			
(83)	Biol.mat. dep	ATCC 39517			
(73)	Innehaver	Novartis Vaccines and Diagnostics Inc, 4560 Horton Street, CA94608 EMERYVILLE, US			
(72)	Oppfinner	Glenn Dorin, San Rafael, CA, US Patrick J. McAlary, San Francisco, CA, US Kathleen M. Wong, Berkeley, CA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å fremstille interferon-beta i en Escherischia coli-vertscelle.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 192811 JP 62282586 US 4499188			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåter for produksjon av interferon- β polypeptider ved bakterielle celler, i det dette skjer ved dyrking av celler som har evne til å produsere IFN- β polypeptidet under betingelser som induserer øket produksjon av IFN- β polypeptidet. Slike betingelser innbefatter, for eksempel, lav kaliumkationkonsentrasjon og/eller meget lav natriumkation konsentrasjon og/eller spesifikke pH områder.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av interferon- β ("IFN- β ") polypeptider i en *Escherichia coli*-vertscelle under visse dyrkningsparametere så som energikilde, ionekonsentrasjon, temperatur og pH, og en sammensetning for produksjon av IFN- β -polypeptid.

5

Rekombinant produksjon av hydrofobe peptider har medisinske og kommersielle anvendelser. For eksempel er IFN- β den første identifiserte effektive behandlingen for de med MS. Det har vist seg å redusere antall angrep på pasienter med tilbakevendende

10

hepatitt B eller C.

Aminosyre- og nukleotidsekvensen til IFN- β er kjent, som vist i Tanauguichi et al., Gene 10: 11-15 (1980). Rekombinant DNA teknologi gjør det mulig å produsere IFN- β som er fri for virus, for eksempel HIV-1, og andre kontaminanter fra humane kilder.

15

Ved hjelp av slik teknologi kan IFN- β bli produsert ved dyrking av en vertscelle transformert med en ekspresjonsvektor som inneholder et gen kodende for aminosyresekvensen til IFN- β . Vertscellen er en som kan transkribere genet å produsere ønkset protein. Disse teknikkene er blitt anvendt for å produsere IFN- β i pattedyr, insekt- og gjærvertsceller som for eksempel beskrevet i Mantei et al., Nature (London) 297: 129 (1982); Ohno et al., Nucl. Acid. Res. 10:967 (1982); og Smith et al., Mol. Cell. Biol. 3:2156 (1983). Muteiner av IFN- β med forbedrede karaktertrekk er også blitt produsert som for eksempel beskrevet i Mark et al., US-PS 4.518.584.

20

Publikasjonene EP 192811, US 499188 og JP 62282586 beskriver produksjon av interferon- β , men omfatter fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

25

Det er en hensikt ifølge foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for produsering av det hydrofobe polypeptidet, IFN- β polypeptider, i høyere utbytte enn med konvensjonelle teknikker. Det er også en hensikt ifølge foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en forbedret fremgangsmåte for produksjon av rekombinant polypeptid i høyere utbytte enn det som blir produsert ved rekombinante teknikker.

30

Oppfinnelsen vedrører følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av interferon- β (IFN- β) i en *Escherichia coli*-vertscelle, kjennetegnet ved at den omfatter:

35

(a) tilveiebringning av en *E. coli*-vertscelle transformert med en vektor omfattende en sekvens som koder for et IFN- β -polypeptid; og

(b) dyrking av cellen under betingelser som effektivt induserer produksjonen av IFN- β polypeptid, i et medium som omfatter ikke høyere enn omtrent 93,2 mM kaliumioner og ikke høyere enn omtrent 100 μ M natriumioner, der pH i mediet opprettholdes mellom omtrent 5,4 og 6,0.

5

Oppfinnelsen omfatter også en sammensetning for produksjon av IFN- β polypeptid, kjennetegnet ved at den omfatter:

(a) en bakteriell celle med evne til IFN- β produksjon; og

(b) et dyrkningsmedium omfattende:

- 10 (i) ikke mer enn omtrent 93,2 mM K^+ -kationer;
 (ii) ikke mer enn omtrent 100 μ M Na^+ kationer; og
 (iii) mellom omtrent 2 og omtrent 100 g/L glyserol,
 der pH i dyrkningsmediet er mellom ca. 5,4 og ca. 5,7.

15 Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser effekten av kaliumkonsentrasjonen på veksten.

Figur 2 demonstrerer effekten av kaliumkonsentrasjonen på polypeptidekspresjonen.

Figur 3 angir effekten av K^+/Na^+ på ekspresjonen av IFN- β polypeptidet, et eksempel på et hydrofobt polypeptid.

20 Figur 4 angir effekten av pH på celleveksten før induksjon.

Figur 5 angir effekten av pH på celleveksten etter induksjon.

Figur 6 viser effekten av karbonkilden på celleveksten og polypeptidekspresjonen.

Figur 7 demonstrerer effekten av temperatur på cellevekst og polypeptidekspresjonen.

25 Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse vedrører dyrkingsbetingelser til vertsceller som har evne til å produsere IFN- β polypeptider. Disse betingelsene fører til forbedret cellevekst og produktutbytte.

Vertscellen blir fortrinnsvis transformert med en ekspresjonsvektor som omfatter den

30 kodende sekvensen til IFN- β polypeptidet. Ekspresjonsvektoren kan også inneholde om ønskelig en promotor, terminator, et replikasjonsorigo og selekterbar markør. Disse komponentene er kjent innenfor fagområdet og kan lett bli oppstilt.

Hydrofobe polypeptider omfatter en mengde hydrofobe aminosyrer, så som leucin,

35 isoleucin, fenylalanin og valin. Hydrofobe residier omfatter omtrent 20% av de totale residiene i et hydrofobt polypeptid, vanligvis omtrent 25% av de totale residiene og mer vanlig er omtrent 30%. Hydrofobe polypeptider har evne til å bli bundet til andre

hydrofobe forbindelser. For eksempel bindes nativ IFN- β til hydrofobe forbindelser så som Bule Dextran, Cibacon BLue F3GA-dekstran, aminobenzen bundet til agarose, aminonaftalen bundet til agarose og aminoanthracen bundet til agarose, (Jankowski et al., *Biochem.* 15(23): 5182 (1976)). En annen karakteristik av hydrofobe proteiner er forholdet mellom α -heliske og β -sheet residier. Hydrofobe proteiner utviser et α -helisk til β -sheet forhold på omtrent 2:1 og mer vanlig er et forhold på omtrent 1,5:1 og mer vanlig er omtrent 1:1. Den primære sekvensen til nativ IFN- β , et typisk hydrofobt polypeptid, utviser et forhold på omtrent 1,1:1 ifølge Chou-Fasman analyser (Hayes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95(2): 872-879 (1980)).

10

I foreliggende oppfinnelse kan et hvilket som helst IFN- β polypeptid bli anvendt. Betegnelsen "interferon- β polypeptider" eller "IFN- β polypeptider" referere til nativ IFN- β , muteiner, analoger og derivater derav. Slike polypeptider som utviser enten lignende biologisk eller reseptorbindende aktivitet som nativ IFN- β polypeptidet. Alle disse IFN- β polypeptidene vil utvise minst 60% av reseptorbindende eller biologisk aktivitet til nativ IFN- β bindende eller biologisk aktivitet til nativ IFN- β . Det er vanlig at polypeptidene utviser minst 75% og enda mer vanlig er det at polypeptidene utviser minst 80% av nativ IFN- β reseptorbinding eller biologisk aktivitet. Biologiske og reseptorbindende analyser er beskrevet i Fellous et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3082-3086 (1982); Czerniecki et al., *J. Virol.* 49(2): 490-496 (1984); Mark et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5662-5666 (1984); Branca et al., *Nature* 294: 768-770 (1981); Williams et al., *Nature* 282: 582-586 (1979); Herberman et al., *Nature* 277: 221-223 (1979); og Anderson et al., *J. Biol. Chem.* 257(19): 11301-11304 (1982).

20

IFN- β polypeptider innbefatter mutanter, fragmenter, fusjoner, analoger og derivater av nativ IFN- β . Alle disse polypeptidene vil utvise en viss sekvensidentitet med nativt IFN- β . Human IFN- β er et eksempel på et nativt IFN- β . Human aminosyresekvens er kjent og er videre vist i SEQ ID NO: 1. Polypeptider vil beholde minst omtrent 80% aminosyreidentitet med SEQ ID NO: 1, mer vanlig er minst omtrent 85% og enda mer vanlig er minst omtrent 90%.

30

Ønsket hydrofobt polypeptid kan bli konstruert fra kjente native sekvenser. For eksempel kan nativt IFN- β bli mutert for å fjerne cysteinet som ikke deltar i disulfidbinding og kan bli mutert til en serin ved anvendelse av in vitro mutagenese teknikker. En slik mutagenese er beskrevet i Mark et al., US-PS 4.518.584. Andre teknikker for konstruering av fragmenter, fusjon, analoger og andre derivater er for

35

eksempel beskrevet i Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Når ekspresjonsvektoren er konstruert kan den bli transformert til et antall vertsceller, både bakterielle og gjærceller. For eksempel utgjør transformasjonsteknikker for følgende bakteriell vert for eksempel: Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP publ. nr. 036 259 og 063 953; PCT WO 84/04541 for *Bacillus*; and Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949 for *Campylobacter*, and Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids in Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer and S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim Biophys. Acta 949:318, for *Escherichia*; and Chassey et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173, for *Lactobacillus*; and Fiedler et al. (1988) Anal. Biochem 170:38; for *Pseudomonas*, Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, for *Staphylococcus*; and Barany et al. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation", in *Streptococcal Genetics* (ed. J. Ferretti and R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infec. Immun. 32:1295; Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology 1:412 for *Streptococcus*.

Foretrukket bakteriell vertscelle er *Escherichia coli*, stamme MM294-1 og ekspresjonsvektor pSY2501 som er deponert ved American Type Culture Collection i Rockville, Maryland under ATCC nr. 39517.

Etter at en vertscelle er blitt konstruert blir den dyrket under betingelser som effektivt induserer produksjonen av hydrofobe polypeptider. Slike dyrkningsbetingelser innbefatter de som muliggjør transkripsjon og translasjon av den kodende sekvensen for å produsere ønsket hydrofobt polypeptid. I løpet av induksjon av polypeptidproduksjonen kan cellene være i enten lag, eksponensiell vekst eller i stasjonær fase. Cellene behøver følgelig ikke å være hurtig delende i løpet av induksjon av polypeptidproduksjonen. Tilstander som kan påvirke den bakterielle produksjonen innbefatter for eksempel, utluftning, pH, temperatur og mediumsammensetning. Eksempler på mediumkomponenter som påvirker produksjonen innbefatter for eksempel karbonkilder, så som glyserol og glukose, sporeelementer, aminosyrer, kationer og anioner.

Oppfinnerne har oppdaget visse betingelser som dramatisk øker ekspresjonen av hydrofobe polypeptider, så som IFN- β polypeptider, i transformerte vertsceller. Slike betingelser innbefatter konsentrasjon av kalium- eller natriumkationer i mediet, pH til mediet og valg av karbonkilde.

I foreliggende oppfinnelse er kaliumkation konsentrasjonen "lav". Kaliumkation konsentrasjonen ifølge foreliggende oppfinnelse til kulturmediet er ikke høyere enn omtrent 93,2 mM, fortrinnsvis ikke høyere enn omtrent 75 mM, og mer foretrukket er at den ikke er høyere enn omtrent 40 mM. For å utføre foreliggende oppfinnelse er det ikke nødvendig å tilsette kalium, men i en foretrukket utførelsesform er konsentrasjonen av kalium ikke mindre enn omtrent 10 med mer. Helst er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at kaliumkationekonsentrasjonen ikke er større enn ca. 40 mM og ikke mindre enn ca. 10 mM. Kaliumkationer kan bli tilsatt til dyrkningsmediet diskontinuerlig i batcher eller kontinuerlig for å tilveiebringe en kontinuerlig, lav konsentrasjon av kaliumioner eller kaliumsalter. Følgende konsentrasjoner er anbefalt at blir tilsatt til en bolus ved begynnende dyrkning.

I en annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er natriumkation konsentrasjonen "meget lav". Vanligvis er natriumkation konsentrasjonen heri ikke høyere enn 100 μ M det er mer vanlig at den ikke er høyere enn 50 μ M. Det er foretrukket at det ikke tilsettes natriumkationer med vilje til dyrkningsmediet. Natriumkationer kan være tilstede i mediet, men i form av en kontaminant fra beholderen eller fra andre tilsatte komponenter. Det er foretrukket at ikke-natrium inneholdende sporeelementer, fosfatsalter, syrer og baser blir anvendt i mediet for å begrense mengden av natriumkationer så mye som mulig. For eksempel blir ammoniumhydroksid fortrinnsvis anvendt heri istedenfor natriumhydroksid.

Ved beregning av K^+ og Na^+ konsentrasjonen i foreliggende oppfinnelse tas det hensyn til Na^+ og K^+ kationene fra de andre komponentene i mediet, så som sporeelementer, fosfatsalter, pH titreringsmidler osv. På grunn av at konsentrasjonen til K^+ og Na^+ som er foretrukket er så lav er et pH titreringsmiddel så som NH_4OH foretrukket, for å unngå tilsetning av K^+ og Na^+ kationer. Fortrinnsvis er fremgangsmåten ifølge oppfinnelse kjennetegnet ved at kationekonsentrasjonen ikke er høyere enn ca. 50 μ M.

En effektiv energikilde må bli tilveiebragt til cellene i løpet av dyrking og produksjon av hydrofobe polypeptider. Det er foretrukket at energikilden ikke vil begrense hverken

dyrkningstiden eller den endelige celletettheten eller IFN- β polypeptid produksjon. Den effektive energikilden kan innbefatte en enkelt eller en blanding av forbindelser. Som diskutert nedenfor er glyserol og glukose foretrukne energikilder. Andre forbindelser, så som fruktose, maltose osv. , kan også være effektive.

5

Glyserol er den foretrukne effektive energikilden. Søkerene har oppdaget at når glyserol blir anvendt blir vekstraten og polypeptid produksjonsraten øket. I en utførelsesform blir cellene bare tilført glyserol. Glyserol trenger derimot ikke å være den eneste energikilden som er tilstede. Energikilder som kan bli metabolisert samtidig med glyserol kan være tilstede dersom de ikke begrenser celleveksten, dyrkningstiden eller polypeptidproduksjon. For eksempel kan en liten mengde glukose bli innbefattet i dyrkningsmediet med glyserol for å redusere lag fasen til cellene. Dersom produksjonen er koblet til tryptofanpromoter, i en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, bør den foretrukne metabolismen av glyserol begynne like før eller ved tidspunkt for tryptofan mangel. Mengden av glukose bør bli begrenset under disse betingelsene.

Vanligvis, når glyserol er karbonkilden, vil konsentrasjonen være minst omtrent 20 g/l, mer vanlig er det at glyserolkonsentrasjonen er mellom omtrent 20g/l og omtrent 100 g/l. Glyserol er derimot tilgjengelig i løpet av induksjonstiden. Vanligvis vil konsentrasjonen av andre energikilder, for eksempel glukose, være mindre enn omtrent 10 g/l, og mer vanlig er det at den er mindre enn omtrent 5 g/l, og ytterligere mer vanlig er det at den er mindre enn omtrent 2,5 g/l.

Mengden av glyserol tilsatt til cellene er ikke kritisk dersom mengden av glyserol ikke begrenser den endelige celletettheten. Vanligvis utgjør en tilstrekkelig mengde glyserol en konsentrasjon mellom omtrent 2 g/l og omtrent 100 g/l. Energikilden kan bli tilført kontinuerlig eller i batcher i løpet av dyrkningsperioden. Alternativt kan energikilden bli tilført i en bolus ved begynnende dyrkning. Det er hensiktsmessig at cellene blir tilført med glyserol i løpet av dyrkningsperioden.

En annen foretrukket effektiv energikilde er glukose. I en utførelsesform blir glukose tilført i begrenset rate. Denne føringstrategien er ulik glyserolføring. Glukose blir tilført ved eller i noe mindre grad enn raten hvorved cellene metaboliserer karbonkilden. En måte å undersøke den begrensede glukoseraten er å registrere polypeptidproduksjonen for kulturer med flere glukosetilførselsrater.

35

Oppfinnerne har også oppdaget at økte nivåer av acetat ikke bare begrenser cellevekst ratene, men undertrykker også hydrofobe polypeptidproduksjonsrater. Yee et al., Biotech. Bioeng. 41: 781-790 (1993) har anmerket at acetat blir produsert når en eller flere av følgende betingelser eksisterer:

5

- (1) oksygen begrensning, dvs. anaerob fermentering;
- (2) næringsmessig overskudd, spesielt karbonkilde (C-kilde), slik at den spesifikke vekstraten overskrider vekstraten hvorved acetat blir dannet (stamme) og mediumavhengig);

10

- (3) høyt partialt trykk av CO₂.

Acetatproduksjonen kan bli gjort mindre ved begrensning av glukosetilførselen gjennom fermentering. Det er videre anbefalt at cellene blir utluftet med et overskudd oksygen i løpet av fermenteringen. Dersom glyserol blir anvendt som effektiv energi kilde som ikke begrenser den endelige celletettheten er oksygen nødvendig for metabolisering av glyserol.

Oppfinnerne oppdaget at når temperaturen i løpet av celledyrkingen ble redusert, øker proteinproduksjonen pr celle. I foreliggende oppfinnelse blir cellene følgelig dyrket ved en temperatur som ikke er mindre enn 34°C, vanligvis ikke mindre enn 37°C, og mer vanlig er ikke mindre enn 39°C. Cellene blir vanligvis dyrket ved en temperatur som ikke er høyere enn 42°C og til og med er det mer vanlig at den ikke er høyere enn 40°C.

I tillegg oppdaget oppfinnerne at pH til kulturmediet i løpet av hydrofob polypeptidproduksjon kan påvirke celleveksten. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter at pH i mediet opprettholdes mellom omtrent 5,4 og 6,0 fortrinnsvis omtrent 5,4 og omtrent 5,7.

Ytterligere aminosyrer behøver ikke å være nødvendig for dyrking av bakterielle vertsceller. Supplementering av kulturen med ytterligere aminosyrer like før og i løpet av induksjonen av polypeptidproduksjonen eller i løpet av den terminale delen av dyrkingstiden kan være nyttig. Supplementering av aminosyrene i løpet av dyrking av bakterielle celler for å øke ekspresjonen er beskrevet i US-PS 4.656.132 og 4.894.334. Tilføring av ytterligere aminosyrer til kulturen kan være ønskelig for å begrense innkorporering av uønskede aminosyrer, så som norleucin. For eksempel kan nor-leucin innkorporering bli hemmet ved tilførsel av en begrenset mengde leucin med isoleucin i overskudd. Alternativt kan threonin og valin også bli tilsatt til kulturmediet for å unngå

nor-leucin innkorporering. Andre aminosyrer kan også bli supplementert til mediet for ikke å begrense produksjonen av polypeptidene.

- Andre fermenteringsbetingelser så som inokuleringstid og antall celler vil bli valgt etter behov og slike faktorer er ikke kritiske ifølge den krevde oppfinnelsen. Andre mediumkomponenter for indusering av polypeptidproduksjonen kan innbefatte sporelementer, karbonkilder, vitaminer osv. Sporelementer innbefatter kobber, jern, mangan, sink, magnesium, osv. Andre karbonkilder innbefatter aminosyrer og lipider. Disse andre mediumkomponenter er et eksempel på faktorer som ikke er kritiske for oppfinnelsen og kan bli valgt for en forenkling. Til tross for at følgende ikke er kritisk for utførelse av oppfinnelsen er det anbefalt at sitrat og suksinat blir opprettholdt i lave konsentrasjoner i løpet av fermenteringen. Det er foretrukket at sitrat og sitratsalt konsentrasjonene er under 5 mM.
- Oppfinnelsen angår også en sammensetning for produksjon av IFN- β polypeptid, kjennetegnet ved at den omfatter:
- (a) en bakteriell celle med evne til IFN- β produksjon; og
 - (b) et dyrkningsmedium omfattende:
 - (i) ikke mer enn omtrent 93,2 mM K^+ -kationer;
 - (ii) ikke mer enn omtrent 100 μ M Na^+ kationer; og
 - (iii) mellom omtrent 2 og omtrent 100 g/L glyserol,
- der pH i dyrkningsmediet er mellom ca. 5,4 og ca. 5,7.

Rensing av hydrofobe polypeptider

1. Høsting
- Cellene kan bli høstet når som helst etter induksjon. Tids-produksjonsstudier kan bli utført for å bestemme tidspunktet etter induksjon når cellene har produsert de mest hydrofobe polypeptidene. For eksempel kan IFN- β polypeptid produserende celler bli høstet ved (1) konsentrering av celler, eller (2) fjerning av uønskede mediumkomponenter før ødeleggelse av cellene. Cellene kan bli sentrifugert ved 20.000 g ved 4°C i 20 minutter. Supernatanten fjernes, og deretter kan cellene bli resuspendert ved en konsentrasjon på 0,1 M natriumfosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl i PBS. Alternativt kan cellene bli konsentrert 5 ganger ved sirkulerende kryss-strømningsfiltrering, ved sirkulering av materiale under trykk gjennom en Millipore spiral ultrafiltreringsbeholder.

Oppfinnerene har oppdaget at ved å redusere ionestyrken til mediet før oppbryting av cellene kan forbedre separeringen av uønskede nukleinsyrer og membrankomponenter fra refraktile legemer omfattende hydrofobe polypeptider. Se Dorin et al., US-PS 5.248.769, innkorporert heri som referanse. For eksempel kan IFN- β

5 polypeptidproduserende celler bli separert fra fermenteringsmediet ved sentrifugering og resuspending i en buffer med lav ionestyrke. Cellene kan bli resuspendert i deionisert vann som eventuelt innbefatter 1-2 mM EDTA, for å chelatere eventuelt gjenværende metallioner. Uønskede mediekomponenter kan også bli fjernet og ionestyrken redusert ved diafiltrering av cellene mot 5-10 volum deionisert vann som eventuelt innbefatter 1-

10 2 mM EDTA. Andre chelatorer kan bli anvendt i stedet for EDTA, så som EGTA.

II. Primær isolering

Det første trinnet ved primær isolering er oppbrytning og eventuelt dreping av cellene

15 som produserer hydrofobt polypeptid. Etter oppbrytning av cellene som produserer IFN- β polypeptidet kan det isolerte IFN- β polypeptidet bli utsatt for ytterligere prosessering, så som solubilisering og denatureringsprosedyrer, eller kan bli utsatt for ytterligere rensning av hele IFN- β refraktile legemer, som isolering med sukrosetetthetssentrifugering.

20

For eksempel kan celler som produserer IFN- β refraktile legemer, som isolering med sukrosetetthetssentrifugering.

For eksempel kan celler som produserer IFN- β polypeptidet bli oppbrutt ved anvendelse

25 av kuler, høytrykkshomogenisering eller sonikering. Eksempler på oppbrytning innbefatter homogenisering ved 6000-7000 psig, ved enten recykliseringsmetoden eller diskret overføringsmetode (fortrinnsvis 3 overføringer ved $\sim 10-15^{\circ}\text{C}$). Alternativt kan cellene bli oppbrutt ved tilsetning av 0,2 μm kuler som spesifisert av Dynomill, blanding av kulene og cellene for å bryte cellene opp. Cellene kan også bli brutt ved

30 sonikering ved for eksempel anvendelse av en Heat Systems Model W-375 ved maksimal kraft i 5 minutter.

For å være i samsvar med regulerende retningslinjer blir gjenværende ikke oppbrutte celler drept. Cellene kan bli drept ved anvendelse av fenol, toluen eller oktanol.

35 Tilsetning av disse reagensene til de oppbrutte cellene kan forårsake fysiske forandringer til de refraktile legemene, så som tetthet eller hydrofobisitet. Disse forandringene kan være kritiske i nedstrømsprosesseringsrensning av ønskede hydrofobe

polypeptider, så som IFN- β . Konsentrering av disse reagensene og inkubasjonstiden til disse reagensene med oppbrutte celler kan kontrollere forandringene dannet på de refraktile legemene. For eksempel kan oppbrutte celler som har produsert IFN- β polypeptidene bli inkubert og agitert over natt med 1% (v/w) oktanol ved 0°C-6°C for å
 5 inaktivere gjenværende celler. Alternativt kan de oppbrutte cellene bli inkubert med 0,25% (v/w) fenol og 0,25% (v/w) toluen i minst 30 minutter ved omtrent 37°C.

For å forbedre separering av det cellulære debriset fra refraktile legemer kan ionestyrken til mediet inneholdende de oppbrutte cellene bli redusert eller så kan mediet bli avsaltet.
 10 Slike teknikker og prosedyrer for reduisering av ionestyrken til mediet før gjenoppbrytning av de oppbrutte cellene er beskrevet i US-PS 4.748.234, innkorporert heri som referanse. For eksempel kan oppbrutte celler som har produsert IFN- β polypeptidet bli sentrifugert ved 20.000 g i 20 minutter ved 4°C, og pelleten resuspendert i deionisert vann som eventuelt innbefatter 1-2 mM EDTA, for å chelatere
 15 gjenværende ioner. Alternativt kan EDTA bli tilsatt til mellom 1-2 mM for å chelatere metallionene. I tillegg kan denne blandingen bli diafiltrert mot 5-10 volumer deionisert vann med 1-2 mM EDTA.

Cellulært debris kan bli dissosiert fra de refraktile legemene ved dispergering av
 20 eventuelt aggregert materiale i lysatet ved homogeniseringsteknikker. Homogeniseringsteknikker innbefatter sonikering, mekanisk agitering eller homogenisering gjennom en liten åpning. For eksempel kan oppbrutte celler som produserer IFN- β polypeptider bli dispergert på ny ved sonikering med en Heat Systems Model W-375 ved maksimal kraft i 5 minutter. Alternativt kan det oppbrutte materialet
 25 bli dispergert på ny ved å sende det gjennom en høytrykshomogenisator tre ganger ved 6000-7000 psig.

Polypeptidrefraktile legemer kan bli ytterligere separert fra uønskede cellulære komponenter ved anvendelse av størrelses eller tetthets differensialmetoder. Lav
 30 hastighets sentrifugering er en separeringsmetode. Se Builder et al., US-PS 4.511.502, innkorporert heri som referanse. For eksempel kan IFN- β polypeptidrefraktile legemer bli sedimentert ved anvendelse av sukrosetetthetssentrifugering for å separere disse fra uønsket cellulært materiale. Faktorer som bestemmer effektiviteten til sukrosetetthetssentrifugeringen innbefatter konsentrering av sukrose, sentrifugal kraften
 35 og gjenværende tid, eller strømningsrate. Den endelige sukrosekonsentrasjonen er kritisk. Anvendelse av 1-oktanol kan begrense prosentandelen av IFN- β polypeptidrefraktile legemer som vil sedimentere. Sukrose blir fortrinnsvis tilsatt til en

endelig tetthet på mellom 1,0 og 1,18 g/ml. For eksempel blir sukrose tilsatt til det oppbrutte materialet til en endelig tetthet på $1,08 \pm 0,01$ g/ml.

For å sedimentere de refraktile legemene kan enten en kontinuerlig strømming eller ladd sentrifuge bli anvendt. Dersom en lab sentrifuge blir anvendt blir IFN- β polypeptid refraktile legemer, for eksempel fortrinnsvis sentrifugert ved 8000 g i minst 10 minutter. Dersom en kontinuerlig strømmingssentrifuge blir anvendt er sentrifugalkraften, strømningsraten og sentrifuge type kritisk. For eksempel blir blandingen fortrinnsvis sentrifugert ved 7.000 g ved en strømningsrate på 0,25 l/minutt i en Westfalia KA2 sentrifuge eller i en Sharples AS16 sentrifuge ved 15.500 g ved en strømningsrate på 2-3 l/min. Det sedimenterte materialet, betegnet partikkelpasta, blir samlet. Dersom disse sentrifugene blir anvendt må de bli stoppet for å oppsamle de refraktile legemene fra sentrifugebeholderen. Med en kontinuerlig strømmingssentrifuge blir supernatanten kontinuerlig fjernet. Andre typer av lab eller kontinuerlig sentrifuge kan bli anvendt, og det er anerkjent at fagfolk innenfor dette området kan utføre nødvendige justeringer på sentrifugal kraft og strømningsrate, for eksempel med disse forskjellige sentrifugene for å produsere en effektiv homogen sukrosepute.

Hydrofobe polypeptider kan bli effektivt isolert ved anvendelse av organisk faseekstrahering. For eksempel kan IFN- β polypeptider bli effektivt isolert fra kontaminanter ved organisk ekstrahering med en alifatisk alkohol. Slike ekstraheringsmetoder er beskrevet i Konrad et al., US-PS 4.450.103; og Hanisch et al., US-PS 4.462.940; innkorporert heri som referanse. Det viktigste er at denne ekstraheringstypen er effektiv for å fjerne uønskede endotoksiner. Ekstrahering for IFN- β polypeptider er mer effektiv dersom IFN- β polypeptidene blir oppløst med en sterk anionisk detergent før ekstrahering og dersom detergenten er tilstede i løpet av ekstraheringen. Det sterke anioniske overflateaktive middelet øker sannsynligvis fordelingseffektiviteten i løpet av den organiske ekstraheringen som reduserer kryss-bindingen av kontaminerende proteiner til ønskede hydrofobiske polypeptider.

Sterke naturlige eller syntetiske anioniske overflateaktive midler, så som alkali metallsalter av fettsyrer og alkali metall alkylsulfater, er foretrukket for solubilisering før organisk ekstrahering. Et slikt middel vil vanligvis inneholde 10 til 14 karbonatomer. Natriumdodecylsulfat (SDS) og natriumlaurat er spesielt foretrukne solubiliseringsmidler. Eksempler på andre solubiliseringsmidler som kan bli anvendt i fremgangsmåten innbefatter, men er ikke begrenset til, natriumdodecylsulfonat,

natriumdodecylsulfat, natriumtetradecylsulfat, natriumtridecylsulfonat, natriummyristat, natriumkaproylat, natriumdodecyl N-sarkosinat og natriumtetradecyl N-sarkosinat.

Mengden av oppløsningsmiddel anvendt i solubiliseringen avhenger av det bestemte
5 middelet og mengden av protein som skal bli solubilisert. Vanligvis varierer
tilstrekkelig oppløsningsmiddel til proteinvektforholdene fra omtrent 1:1 til 10:1. Når
SDS blir anvendt blir et SDS til proteinforhold på omtrent 1:1 til 10:1, fortrinnsvis
omtrent 7:1 til 2,5:1, anvendt. Temperaturer i området 15°C til 60°C blir vanligvis
anvendt i solubiliseringen. Solubiliseringen blir betraktet å være fullført når
10 oppløsningen er vesentlig klar. For eksempel når OD₂₈₀ til oppløsningen når omtrent
4,0 til 8,0 er oppløsningsprosessen betraktet å være fullført.

For fullstendig solubilisering av de refraktile legemene er tilsetning av et
reduksjonsmiddel anbefalt. Ditiotreitol, β -merkaptoetanol og tioglykolsyre er eksempler
15 på reduksjonsmidler. For refraktile legemer som omfatter IFN- β polypeptider blir
ovennevnte reduksjonsmiddel fortrinnsvis anvendt ved omtrent 50 mM. Ekstreme
verdier i pH og/eller temperatur kan lette eller forårsake solubilisering. IFN- β
polypeptider som et eksempel ved justering av pH til mellom 9,0 og 11,0 i
solubiliseringbufferen. Oppvarming av blandingen til 50°C til 55°C eller så høyt som
20 95°C i minst 20 minutter vil lette solubiliseringen. Solubiliseringstiden vil vedvare
dersom de refraktile legemene er for konsentrerte. For IFN- β polypeptid refraktile
legemer kan proteinkonsentrasjonen variere mellom 3-8 mg/ml, og solubiliseringen vil
forløpe effektivt. Solubilisering og reduksjon av refraktile legemer er effektivt ved
proteinkonsentrasjoner på 0,5 til 25 mg/ml.

25 Et chelateringsmiddel, så som EDTA, EGTA eller citrat kan bli innbefattet i
solubiliseringbufferen for å oppta uønskede metallioner, som kan forårsake uønsket
oksidasjon og reaggregasjon. For IFN- β polypeptider, typisk hydrofobiske polypeptider,
er følgende konsentrasjoner anbefalt 2 mM EDTA, 2 mM EGTA eller 5 mM citrat.

30 Etter solubilisering blir ionestyrken til oppløsningen justert, om nødvendig, til et nivå
hvor oppløsningen og det organiske ekstraheringsmiddelet hver vil være vesentlig
ublandbare. Ionestyrken vil være i området fra 0,05 til 0,15. Uorganiske salter, så som
NaCl, kan bli tilsatt til oppløsningen for dette formålet. Slike ionestyrker muliggjør
35 faseeparasjon etter ekstrahering. Ekstraheringsmidlene anvendt i fremgangsmåten er 2-
butanol, 2-metyl-butanol eller blandinger derav. Blandingene inneholder fortrinnsvis
mindre enn omtrent 50 volum-% 3-metyl-butanol. 2-butanol er et foretrukket

ekstraheringsmiddel for IFN- β polypeptider. Homologe alkoholer ble funnet å være ineffektive ekstraheringsmidler. Ekstraheringsmiddelet vil normalt bli kombinert med den vandige oppløsningen av IFN- β polypeptidet i volumetriske forhold i områder på omtrent 0,8:1 til omtrent 3:1, fortrinnsvis omtrent 1:1 (ekstraheringsmiddel:vandig oppløsning). Ekstraheringen kan bli utført ved anvendelse av konvensjonell batch eller kontinuerlig væske-væske ekstraheringsteknikker og utstyr. Ekstraheringen vil normalt bli utført ved 20°C til omtrent 100°C. Ekstraheringen vil innbefatte kontakttyder i området på omtrent 1 minutt til 1 time. Optimal kontakttid vil avhenge av den bestemte solubilisierende middel:ekstraheringsmiddel kombinasjon. Når SDS blir anvendt kan kortere tidere i ovennevnte områder bli anvendt. Når natriumlaurat blir anvendt er lengre tidspunkter i området ventet. pH til ekstraheringsblandingen vil variere mellom omtrent 6 og 9, i det en pH på omtrent 7,5 er foretrukket når SDS blir anvendt, og en pH på omtrent 8,5 når natriumlaurat blir anvendt.

Ved ekstrahering blir den vandige fasen og ekstraheringsmiddelfasen separert, og det hydrofobe polypeptidet blir isolert fra ekstraheringsfasen. Den bestemte isoleringsprosedyren som blir anvendt vil avhenge solubiliseringsmiddelet involvert og ønsket renhetsgrad. Forskjellige isoleringsteknikker så som presipitering, molekylær sikt kromatografi, affinitetskromatografi og elektroforese kan bli anvendt.

Når SDS anvendes med IFN- β polypeptidet kan andre proteiner bli presipitert fra ekstraheringsmiddelet blandet med vandig buffer ved volumetriske forhold på omtrent 2:1 til omtrent 5:1, fortrinnsvis omtrent 3:1, ved redusering av pH, vanligvis til mellom 5 til 7, mer vanlig er omtrent 6,5. Det organiske ekstraktet inneholdende IFN- β polypeptidet kan bli blandet med en buffer inneholdende 0,1% SDS, i 10 mM fosfat, 0,9% saltvann, pH 7,4 og DTT blir tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 5 mM for å forsikre at IFN- β polypeptidet forblir i en redusert monomerisk tilstand. Blandingen blir latt komme til omtrent 20°C. Deretter kan pH organiske ekstrakter bli justert til omtrent $6,2 \pm 0,1$ for å presipitere IFN- β polypeptidene. Presipitatet kan bli samlet ved sentrifugering eller filtrering. Presipitatet ble isolert ved sentrifugering av blandingen med en Sharples AS16 sentrifuge ved 15.500 g og en strømningsrate på 2-3 l/min.

Presipitatet kan bli resuspendert i en bufferoppløsning som er hensiktsmessig for ytterligere rensningsprosedyrer eller foldereaksjoner.

III. Refolding-oksidasjon

Refoldings- og oksidasjonsbetingelser vil variere fra polypeptid til polypeptid. Vanligvis vil polypeptider bli oppløst og redusert til monomer form før oksidasjon og refolding. Følgende angir spesifikke betingelser for refolding av IFN- β polypeptidene.

- 5 IFN- β polypeptidet som er et resultat fra solubilisering av IFN- β refraktile legemer kan bli refoldet og oksidert til biologisk aktiv konformasjon ved forskjellige betingelser som vist i Mark et al., US-PS 4.518.584, innkorporert heri som referanse.

- For refoldings- og oksidasjonsbetingelser er det å bemerke to i stor skala fremstillinger.
- 10 For det første maksimaliseringsgjennomløp, og for det andre minimalisering av kildene som blir anvendt. En effektiv benke-skala prosess behøver ikke å være kostnadseffektiv når den blir skalert opp lineært. Fremgangsmåtettrinnene ifølge oppfinnelsen kan følgelig variere avhengig av utstyr og materiale som er tilgjengelig og kost-effektive. For eksempel kan IFN- β polypeptider bli refoldet ved en konsentrasjon som er så høy som 1
 - 15 mg/ml. Denne konsentrasjonen kan være foretrukket når reaksjonsbeholdervolumet og buffermaterialet er begrenset. IFN- β polypeptidet kan derimot bli refoldet ved en konsentrasjon så lav som 0,01 mg/ml. Konsentrasjonen av IFN- β for refolding er også avhengig av mengden av kontaminant som er tilstede. Desto høyere konsentrasjonen av kontaminerende materiale er desto lavere konsentrasjon av IFN- β polypeptidet er
 - 20 nødvendig for effektiv refolding. For en renhet på omtrent 90% utgjør optimal refoldingskonsentrasjon av IFN- β polypeptidet 0,13 mg/ml.

- IFN- β polypeptidet kan lett bli refoldet uten et ytterligere oksidasjonsreagens ved å fjerne reduseringsmiddelet, dersom dette er tilstede, og muliggjøring av oksidasjon med
- 25 atmosfærisk oksygen. Som vist i eksempel 8 i Mark et al., US-PS 4.518.584.

- Om ønskelig er det mange kjente oksidasjonsreagenser som kan bli anvendt for å refolde IFN- β polypeptider, for eksempel 8 μ M CuCl₂ eller 20 μ M iodsobenzosyre (IBA). I tillegg til oksidasjonsreagenset kan oksidasjonsbufferen inneholde en chelator, så som
- 30 1mM EDTA eller 1 mM EGTA, for å forhindre uønsket oksidasjon ved metallionkontamineringsmidler. Det er innlysende at chelatorer ikke er ønskelig når kobberionene er oksidasjonsreagenset. Et kaotrofisk middel kan også bli innbefattet i oksidasjonsbufferen for å redusere mengden av IFN- β polypeptidoligomerer som blir produsert i oksidasjonsreaksjonen. Det kaotrofiske middelet bør ikke ha en så høy
 - 35 konsentrasjon at den forhindrer refoldingen. Nyttige kaotrofiske midler innbefatter 0,1% SDS, 2 M urea og 2 M guanidinhidroklorid. I tillegg anbefaler søkerene at pH i løpet av refoldingen og oksidasjonen blir opprettholdt mellom 5,0 og 9,0.

En refolding-/oksidasjonsprotokoll er beskrevet i Mark et al., US-PS 4.518.584, eksempel 11. IFN- β polypeptidet ble tilsatt i ekvimolare mengder til iodsobenzosyre (IBS) i en reaksjonsbeholder inneholdende 2 mM natriumpyrofosfat, 0,1% SDS og 1 mM EDTA. pH ble kontrollert i løpet av oksidasjonen ved $9,0 \pm 0,1$ med 0,5 N NaOH og justert til $5,5 \pm 0,2$ når oksidasjonen var fullført. Alternativt kan IFN- β polypeptidet bli tilsatt i ekvimolare mengder til 15 μ m IBA, 2 mM pyrofosfat, 0,1% SDS og 1 mM EDTA buffer i løpet av 5 timer. pH blir opprettholdt ved $9,0 \pm 0,1$ med NaOH. Deretter blir iodzobenzosyre tilsatt til et 20 μ m overskudd i en ytterligere time. Reaksjonen kan bli avsluttet etter omtrent 7 til 7,5 timer ved å redusere pH til mellom 5,2 og 5,7. IFN- β polypeptidet kan gjennomgå multiple oksidasjonsreaksjoner for å øke mengden av refoldet IFN- β polypeptid.

15 V. Kolonnekromatografi

Kolonnekromatografi er et middel for å isolere hydrofobe polypeptider til ønsket renhet. Polypeptider kan bli isolert basert på størrelse, hydrofobisitet og andre karaktertrekk. Den spesifikke prosedyren er ikke kritisk og blir valgt basert på hensiktsmessighet. Eksempler på kolonnekromatografiprosedyre anvendt på IFN- β polypeptider, et vanlig hydrofobt polypeptid, er beskrevet i Mark et al., US-PS 4.518.584, Lin et al., Meth. Enzym. 119: 183-192 (1986).

IFN- β polypeptider kan bli isolert basert på ladning, størrelse eller hydrofobisitets karaktertrekk. Spesifikke eksempler på nyttige kolonner er høytrykks væskekromatografi (HPLC), revers fase HPLC og Sephacryl. Flere kolonnekjøringer eller kolonnetyper kan bli nødvendig for å fjerne kontaminantene. Antall eller type kolonner vil bli valgt ifølge ønsket rensing, tidsbestemmelse og økonomiske parametere. Den spesifikke prosedyren valgt er ikke kritisk for utførelse av oppfinnelsen. Kolonnekromatografi kan foregå før eller etter refolding av IFN- β polypeptidet.

30 Kolonnekromatografi er fordelaktig i forhold til refolding for å fjerne kontaminanter som kan interferere eller begrense IFN- β polypeptid refoldingseffektivitet.

En kolonnekromatografiprosedyre anvendes to Sephacryl kolonner. IFN- β polypeptidene blir utsatt for en Sephacryl S-200 og deretter for en Sephacryl G-75 kolonne for en endelig rensing på 99% renhet.

Først blir oppløste IFN- β polypeptid refraktile legemer ekstrahert med et organisk oppløsningsmiddel og syrepresipitert. Deretter blir IFN- β polypeptidene kromatografert på dobbelt 2,6 x 80 cm kolonner pakket med Sephacryl S-200 Superfine. Kolonnene blir ekvilibrert og eluert med 50 mM natriumacetat, pH 5,5 2 mM DTT og 0,5 mM EDTA.

5 Prøvevolum på 10-20 μ M (5-10 mg protein/ml) og strømningsrater på 1-2 ml/minutter er anbefalt. Proteineluering kan bli registrert ved absorbanse ved 280 nm og biologisk aktivitet kan bli kvantifisert ved interferonanalyse (CPE).

Fraksjoner med maksimal IFN- β polypeptidrenhet og IFN- β biologisk aktivitet blir slått sammen. Renheten kan bli vurdert ved SDS-PAGE og Coomassie farving. I dette stadiet

10 blir prøver av interferon med mer enn 95% renhet oppnådd. I mange biologiske og kjemiske analyser er dette renhetsnivået tilstrekkelig. Dersom det er nødvendig at materialet har høyere enn 99% renhet blir ytterligere gelpermeasjonskromatografi (Sephadex G-75) utført.

15 Hovedkontaminanter etter Sephacryl S-200 kromatografi (arter med lav molekylvekt som ser ut til å være en blanding av IFN- β polypeptidfragmenter og E. coli proteiner) blir effektivt fjernet ved ytterligere gelfiltrering på Sephadex G-75 (Superfine). Etter Sephacryl S-200 kromatografi blir IFN- β polypeptidblandingen konsentrert og applisert

20 på en 2,6 x 80 cm kolonne med Sephadex G-75. Kolonnen ble på forhånd ekvilibrert med 50 mM natriumacetat, pH 5,5, 2 mM DTT og 0,5 mM EDTA. Denne bufferen blir også anvendt for proteineluering. Prøvevolum på 5-15 ml og strømningsrater på 0,5-1,0 ml/min. er anbefalt. Eluatet blir på ny registrert ved UV absorbanse ved 280 nm og fraksjoner blir vurdert ved SDS-PAGE analyse og CPE analyser.

25 En annen IFN- β polypeptid kolonne kromatografi prosedyre anvender tre Sephacryl kolonner ved anvendelse av en Sephacryl S-200 kolonne kjørt før og etter refolding og en endelig Sephacryl G-75 for å oppnå ønsket renhetsgrad.

30 Før kromatografiisolering blir solubiliserte IFN- β polypeptid refraktile legemer ekstrahert av organisk oppløsningsmiddel og syren presipitert. IFN- β polypeptid presipitatet blir igjen oppløst og behandlet med et reduksjonsmiddel, så som 20 mM DTT eller 10 mM β -merkaptoetanol, for å beholde IFN- β polypeptidet i redusert, monomerisk tilstand. I tillegg kan IFN- β polypeptidpresipitatet bli resuspendert med et

35 kaotropisk middel, så som 5% SDS eller 6 M urea, til monomeriske IFN- β polypeptider. For å forhindre dannelse av uønskede IFN- β polypeptid oligomerer kan chelatorer, så som 5 mM EDTA eller 5 mM EGTA bli tilsatt for å oppfange metallioner som kan

fremme oksidasjonen av sulfhydrylgruppene. Nyttige buffere innbefatter 50 mM natriumfosfat eller 50 mM Tris-HCl.

- 5 pH blir justert til $8,5 \pm 0,1$ med natriumhydroksid og oppløsningen blir oppvarmet til mellom 45°C til 55°C i omtrent 10 minutter for å lette reduksjonen. Blandingen blir avkjølt til under 30°C og pH justert til mellom 5,2 til 5,8 med iseddiksyre og filtrert gjennom et 0,2 µm Sartobran kapselfilter.

- 10 Sephacryl S-200 Superfine er et gelfiltreringsvæske kromatografmedium som blir dannet fra kovalentlig koblet allyldekstran og N,N'-metylenbisakrylamid med en eksklusjonsgrense på 250.000. S-200 blir pakket i 6 gelfarmasi kolonner. Kolonnen blir først ekvilibrert med NLT 80 L 50 mM acetatbuffer, 1% SDS, 1 mM EDTA, pH 5,5. Kolonnen blir applisert med solubilisert IFN-β polypeptid ekstrahert med organisk oppløsningsmiddel og syrepresipitert. IFN-β polypeptidet blir eluert fra kolonnen med 15 50 mM acetat, 1% SDS, 1 mM EDTA, pH 5,5. Etter at IFN-β polypeptidet blir refoldet blir dette applisert og eluert fra en Sephacryl S-200 kolonne ifølge betingelsene beskrevet ovenfor. De ønskede fraksjonene blir slått sammen og konsentrert til mindre enn 4 L ved anvendelse av en Amicon ultrafiltreringsbeholder.

- 20 Sephadex G-75 er et kule-dannet, kryssbundet dekstran gelfiltreringsmedium. Kolonnen blir ekvilibrert med NLT 80L 50 mM acetatbuffer, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 5,5. Kolonnen blir applisert med ikke mer enn 8 g protein og IFN-β polypeptidet blir eluert med ekvibreringsbufferen. De sammenslåtte fraksjonene inneholdende IFN-β polypeptidet kan bli oppbevart med 2-8°C i opptil 6 måneder eller ved -20°C eller 25 kaldere i 1 år før formuleringen.

V. Formulering

- Formulering av ønskede hydrofobe polypeptider vil variere avhengig av det spesifikke polypeptidet. Polypeptider kan bli formulert for å bli lagret i flytende, frossen eller 30 lyofilisert form. Formuleringen kan bli valgt basert på hensiktsmessighet. Følgende kan bli anvendt for å formulere IFN-β polypeptider for lyofilisering.

- Renset IFN-β polypeptid blir formulert ved tilsetning av hensiktsmessige 35 sterilkomponenter for å beskytte IFN-β polypeptidet i løpet av alle lagringsstadiene og anvendt.

IFN- β polypeptider oppnådd i henhold til foreliggende oppfinnelse kan bli formulert enten som et enkelt produkt eller blandinger av forskjellige IFN- β polypeptider. IFN- β polypeptider blir formulert med farmasøytiske akseptable prepareringer, et fysiologisk kompatibelt bærermedium for klinisk og terapeutiske anvendelser. Andre fysiologiske
5 kompatible forbindelser kan også bli innbefattet i formuleringen, så som dekstrose, humant serumalbumin osv.

IFN- β formuleringen kan inneholde en konsentrasjon IFN- β polypeptid mellom 0,25 mg/ml til 15 mg/ml. Mengden IFN- β polypeptid innbefattet i formuleringen er ikke
10 kritisk for oppfinnelsen og vil avhenge av doseringen som blir gitt for en bestemt indikasjon og leveringsregime.

Sukkere kan bli anvendt for formulering av IFN- β polypeptider inkludert mannitol, dekstrose og sukrose. Vanligvis for en formulering som skal bli lyofilisert, er
15 konsentrasjonen av mannitol mellom 1% (wt/v) og 5% (wt/v); mer vanlig er konsentrasjonen omtrent 2,5%. For dekstrose er konsentrasjonen mellom 0,5% (wt/v) og 2% (wt/v); mer vanlig er konsentrasjon på omtrent 1,25% (wt/v). For IFN- β polypeptidformulering er sukrosekonsentrasjonen mellom 1% (wt/v) og 5% (wt/v); og mer vanlig er det at konsentrasjonen er omtrent 1,75%.

20 Eksempler på amorfe beskyttelsesmidler som kan bli innbefattet i IFN- β polypeptidformuleringene er dekstran, trehalose, 2-hydroksypropyl- β -cyklodekstrin, aminosyrer, så som glycin eller humant serumalbumin. Disse beskyttelsesmidlene hjelper til med å redusere de fysiske og kjemiske endringene i IFN- β polypeptider, så
25 som oksidasjon osv. En effektiv mengde av amorft beskyttelsesmiddel vil forhindre uønsket aggregasjon, kjemisk binding, oksidasjon og degradering av IFN- β polypeptidet. For mye amorft beskyttelsesmiddel vil forhindre effektiv lyofilisering og for lite vil redusere oppbevaringstiden til lyofilisert produkt.

30 Glycin kan bli tilsatt til IFN- β polypeptid formuleringen til en sluttkonsentrasjon på minst 0,01% (wt/v), mer vanlig minst 0,3% (wt/v). Glycinkonsentrasjonen i formuleringen er ikke mer enn 1% (wt/v), mer foretrukket er ikke mer enn 0,7% (wt/v).

Humant serumalbumin (HSA) kan også bli tilsatt til formuleringen som et
35 beskyttelsesmiddel. HSA blir tilsatt til IFN- β polypeptidformuleringen til en sluttkonsentrasjon på minst 0,01% (wt/v), mer vanlig er minst 0,5% (wt/v).

Glycinkonsentrasjon i formuleringen er ikke mer enn 2,5% (wt/v), mer foretrukket ikke mer enn 1,25% (wt/v).

5 Buffere kan bli anvendt for å opprettholde pH til formuleringen i løpet av lyofiliseringen, lagringen og når IFN- β polypeptidet er rekonstituert. Opprettholdelse av pH er kritisk for å forhindre slike fysiske eller kjemiske endringer så som oksidasjon, i løpet av lagringen av IFN- β polypeptidet. pH blir valgt, ikke bare for å optimalisere levetiden til IFN- β polypeptidet, men for å lette administreringen av IFN- β polypeptid til mennesker. Vanligvis blir pH til formuleringen justert til mellom 6,0 og 7,5 med NaOH
10 dersom et natriuminneholdende buffringsreagens blir anvendt. Det er mer foretrukket at pH blir justert til 6,5.

Natriumcitrat eller fosfat er eksempler på amorfe buffere. Natriumcitrat blir tilsatt til formuleringen til en sluttkonsentrasjon på minst 1 mM, og mer foretrukket minst 4 mM.
15 Vanligvis er konsentrasjonen av natriumcitrat i formuleringen ikke mer enn 10 mM, og mer vanlig ikke mer enn 6 mM.

Når IFN- β polypeptidene blir formulert etter behov kan en slik formulering bli lagret som en frossen væske eller bli lyofilisert. Lagringsformen til en IFN- β
20 polypeptidformulering er ikke kritisk for foreliggende oppfinnelse og blir valgt etter behov.

US-PS 5.183.746 beskriver IFN- β væskeformuleringer som blir lagret som frosne væsker i stedet for i lyofilisert form. Ifølge '756 kan frosne væskeformuleringer
25 inneholde glyserol og en kombinasjon av biokompatible ikke-ioniske polymeriske detergenter og en liten mengde buffer for å opprettholde formuleringen ved ønsket pH.

Foretrukne konsentrasjoner av glyserol er fra omtrent 0,005% til og med 5%; mer foretrukket er fra omtrent 0,01% til omtrent 3%; mer foretrukket er fra omtrent 0,05% til
30 omtrent 1,5%. Når glyserol er tilstede i væskeformuleringene ved et konsentrasjonsområde i volum på fra omtrent 5% til omtrent 50%, fortrinnsvis fra omtrent 20% til omtrent 30% og mer foretrukket omtrent 25%, kan kombinasjonen av ikke-ioniske detergenter som virker med glyserol bli tilsatt i lavere konsentrasjon, og den foretrukne konsentrasjonen er fra omtrent 0,0005% til omtrent 5%, fortrinnsvis fra
35 omtrent 0,001% til omtrent 1%, og mer foretrukket er fra omtrent 0,01% til omtrent 0,5%. En foretrukket detergent er SDS.

For eksempel kan den flytende formuleringen bli lyofilisert ifølge teknikker kjent innenfor fagområdet. Vanligvis omfatter lyofiliseringsprosedyren et frysetrinn, et primært tørketrinn og et sekundært tørketrinn.

5 Formuleringen blir frosset for å:

- (1) fryseprotein;
- (2) fryse uønsket vann; og
- (3) danne en matrise, for å lette rekonstitusjon av proteinet.

10

I løpet av frysetrinnet kan formuleringen gjennomgå flere temperaturskift for å fryse og for å krystallisere formuleringskomponentene. Se Williams et al., J. Parent. Sci. Tech. 38(2): 48-59 (1984), på side 49, nederste høyre kolonne. Disse skiftene i temperatur blir utført ved normale atmosfæriske trykk og formuleringen blir følgelig ikke tørket i løpet

15

av disse temperaturskiftene.

For å fryse vannet i formuleringen er frysetemperaturen under 0°C; mer vanlig under -20°C; mer vanlig er det at formuleringen blir frosset under -50°C. Beholdere inneholdende formuleringen kan bli frosset i lyofiliseringsinnretningen ved at

20 atmosfærisk trykk. Temperaturen til formuleringen blir kontrollert av oppbevaringstemperaturen i lyofiliseringsinnretningen. Vanligvis blir beholderene plassert på en for-avkjølt hylle, 10°C, og deretter blir hylletemperaturen redusert for å fryse formuleringen. Temperaturen kan bli redusert ved en rate på mellom 33°C pr time og omtrent 45°C pr time. Formuleringen bør bli holdt ved ønsket temperatur i omtrent

25 30 minutter til 2 timer eller mer.

Deretter blir formuleringen tørket i 2 trinn, primær og sekundær tørking. I løpet av begge trinnene blir romtrykket redusert under atmosfæriske trykk for å tvinge vannet til å forløpe direkte fra fast til gassfase, dvs. sublimere. Den primære tørkingen begynner

30 etter at formuleringen er frosset og det meste av vannet blir fjernet ved dette trinnet. I løpet av den primære tørkingen blir trykket i prøvebeholderen redusert, og beholdertemperaturen til lyofiliseringsinnretningen blir øket og holdt konstant ved en primær tørketemperatur. Hylletemperaturen blir holdt konstant for å muliggjøre at produkttemperaturen ekvilibrerer med hylletemperaturen som vist i figur 1 på side 49 til

35 Williams et al., supra. Vanndampen blir avgitt i kondensatoren til lyofiliseringsinnretningen som igjen innfryser dampen.

Trykket i prøvebeholderen blir redusert til "subatmosfæriske trykk". Subatmosfæriske trykk refererer til et hvilket som helst trykk under en atmosfæreenhet. Fortrinnsvis vil det subatmosfæriske trykket være mellom 510 μmHg ; mer foretrukket mellom 200 til 50 μmHg ; ytterligere mer foretrukket er omtrent 70 μmHg .

5

Vanligvis blir væskeformuleringen eller frossen produkttemperatur justert ved å forandre hylletemperaturen til lyofiliseringsinnretningen. Prøvetemperaturen, om prøven er fast eller flytende, henger vanligvis etter hylletemperaturen. Prøvetemperaturen kan bli endret til en måltemperatur ifølge to teknikker. For det første kan hylletemperaturen bli endret og holdt konstant ved en måltemperatur helt til prøven ekvilibrerer med hylletemperaturen. Eller så kan hylletemperaturen bli justert sakte til en måltemperatur slik at temperaturforskjellen mellom hyllen og prøven er minimal. En hvilke som helst metode er effektiv for forandring av prøvetemperaturen. Valg av teknikker vil avhenge av ønsket rate til temperaturforandringen. Temperaturen bør derimot ikke bli øket så hurtig slik at vann blir avdampet isteden for tørketemperatur ved en rate på mellom omtrent 30°C pr time til omtrent 60°C pr time. Formuleringen blir holdt ved ønsket primær tørketemperatur mellom omtrent 3 til 15 timer.

Etter at den primære tørkingen er fullført, på ny under redusert romtrykk, blir hylletemperaturen øket til en sekundær tørketemperatur og deretter holdt konstant. Hylletemperaturen blir holdt konstant for å muliggjøre at produkttemperaturen ekvilibreres med hylletemperaturen. I løpet av den sekundære tørkingen blir vann som er tett bundet til produktet fjernet.

Vanligvis blir hylletemperaturen øket til mellom omtrent 15°C og 30°C for sekundær tørking. Temperaturen blir øket til den sekundære tørketemperaturen i en rate på mellom omtrent 30°C pr time til omtrent 60°C pr time. Formuleringen blir oppbevart ved ønsket primær tørketemperatur som er noe mellom omtrent 3 til 15 timer.

Beholderene kan bli fylt under trykk med forskjellige gasser. Beholderen kan bli trykkbelastet mellom 12 psi med ønsket gass. Gassene som begrenser den kjemiske modifikasjonen av IFN- β polypeptider er foretrukket, så som N_2 .

Alle patenter, patentsøknader og andre publikasjoner sitert er heri innkorporert som referanse.

35

C. Eksempler

Eksempelene angitt nedenfor er gitt som en ytterligere veiledning for utøveren innenfor dette fagområdet.

5

Eksempel 1: Konstruksjon av en celle med evne til å produsere IFN- β polypeptid

En *Escherichia coli* vertscelle ble transformert med en ekspresjonsvektor inneholdende et gen kodende for et IFN- β polypeptid. Det kodede IFN- β polypeptidet har samme sekvens som SEQ ID NO: 1 med unntagelse av at det har en serin istedenfor en cystein i
10 posisjon 17 til SEQ ID NO: 1. Konstruksjonen av denne cellelinjen er beskrevet i Mark et al., US-PS 4.518.584, innkorporert heri som referanse.

Det humane IFN- β genet ble isolert, modifisert og overført inn i en prokaryot vert, *E. coli*, som dannet en celle med evne til IFN- β polypeptidproduksjon. Det native IFN- β
15 genet ble modifisert for å kode for et protein som har en serin i stedet for en cystein i aminosyreposisjon 17, ifølge SEQ ID NO: 1.

Denne modifikasjonen ble dannet for å utelukke dannelsen av IFN- β polypeptider med uønsket tertiær struktur på grunn av ukorrekt disulfidbinding mellom cysteinresidene.
20 Cystein 17 deltar ikke i disulfidbinding i det aktive native humane IFN- β polypeptidet. Sete-rettet mutagenese ble følgelig anvendt for å erstatte en serin i stedet for cystein for å forhindre uønsket disulfid binding.

For å gjøre dette ble det native humane IFN- β genet først isolert og dets lederpeptid
25 sekvenser deletert. *E. coli* TRP promotersekvensen ble isolert og vektoren som innkorporerer disse komponentene ble konstruert. IFN- β genet ble subklonet inn i bakteriofag M13mp8 for å produsere et enkelttrådet DNA inneholdende den native humane IFN- β kodende sekvensen. Kodonet for aminosyren cystein i posisjon 17 ble modifisert for å kode for et serin. Fag DNA inneholdende serin modifisert IFN- β
30 polypeptidgen ble isolert. Det modifiserte genet ble tatt ut fra fag DNA og skutt inn i en vektor inneholdende en korrekt orientert *E. coli* trp promoter. Denne vektoren ble betegnet plasmid pSY2501. *E. coli* stamme MM294-1 ble transformert med dette plasmidet for å danne en celle med evne til å produsere et IFN- β polypeptid.

35 En klon, 4E1, ble anvendt inneholdende den fullstendige sekvensen kodende for det native modne humane IFN- β proteinet og dets lederpeptid. For å fjerne sekvensen for lederpeptidet ble genet isolert ved spaltning av klonen med HhaI restriksjonsenzymet og

1.2 kilobase dobbelttrådet HhaI fragment inneholdende IFN- β sekvensen ble smeltet for å separere DNA til enkelttrådet cDNA. Et syntetisk oligonukleotid med sekvensen TATGAGCTACAAC (SEQ ID NO: 2) ble anvendt for å hybridisere DNA ved siden av lederpeptidsekvensen. 5' enden til oligonukleotidet begynte med base T for å regenerere et HindIII sete foran initieringskodon ATG. DNA polymerase I behandlingen (3' til 5' eksonukleolytisk aktivitet) fjernet enkelttrådet DNA kodende for lederpeptidet. Enzymets polymeraseaktivitet gjenopprettet den native humane IFN- β sekvensen til et dobbelt-trådet cDNA med en 5' buttendet terminus. PstI restriksjonsenzymet ble anvendt for å spalte reparert DNA og resulterte i et 144 basepar (bp) fragment kodende for den N-terminale delen av den native humane IFN- β genet. IFN- β cDNA var nå et 5' buttendet fragment begynnende med base T, etterfulgt av initieringskodon ATG som koder for modent protein N-terminus methionin og som avsluttet ved PstI setet til genet.

For å oppnå full-lengde nativ human IFN- β sekvens ble fragmentet kodende for C-terminusen til den native humane IFN- β sekvensen isolert fra den opprinnelige klonen 4E1 ved spaltning av denne med PstI og BglII restriksjonsenzymet og isolering av 359 bp PstI-BglII fragmentet. Ved fremstilling for innskudd av IFN- β cDNA ble plasmid pBR322 spaltet med HindIII restriksjonsenzymet, etterfulgt av DNA polymerase I for behandling til butt-ende HindIII setet. BamHI restriksjonsenzymet ble deretter anvendt for å fjerne en del av det åpne plasmidet som et nødvendig HindIII-BamHI fragment. N-terminusen og C-terminusen kodende for IFN- β fragmentene ble deretter skutt inn i preparert pBR322 i en treveis ligering: den reparerte 5' enden til IFN- β N-terminus fragmentet ble butt-ende ligert til det reparerte HindIII setet, 3' PstI enden til N-terminus fragmentet og 5' PstI enden av det C-terminus kodende fragmentet ble ligert og 3' BglII setet til C-terminus kodende fragmenter ble ligert til den BamHI kohesive enden i pBR322 for å danne et XhoII sete. Den resulterende klonen ble betegnet p β 1-25.

Plasmid ptrp3 var kilden for trp promoteren. trp promoteren ble isolert fra ptrp3 ved spaltning med EcoRI og HindIII restriksjonsenzymet. Disse enzymene ble også anvendt for å spalte plasmid p β 1-25 og ved fjerning av den mellomliggende EcoRI-HindIII sekvensen. Fragmentet inneholdende trp promoteren ble ligert inn i p β 1-25 som et EcoRI-HindIII fragment. Den resulterende klonen ble betegnet p β 1-trp.

For seterettet mutagenese ble restriksjonsenzymene HindIII og XhoII anvendt for å spaltet ut den native humane IFN- β kodende sekvensen fra plasmid p β 1-trp. En kort del av dobbelttrådet, replikativ form (RF) M13mp8 fag DNA ble fjernet ved spaltning med restriksjonsenzymene HindIII og BamHI for å huse IFN- β sekvensen som deretter ble

ligert på plass. Setene spaltet med XhoII og BamHI har kompatible klebrige ender og i dette tilfellet regenererte den resulterende ligeringen XhoII setet. Rekombinant fag DNA ble transformert inn i kompetente celler til E. coli stamme JM103 som er en stamme som vanligvis blir anvendt for produksjon av M13 fag DNA. Restriksjonsenzymene ble
 5 anvendt for å identifisere RF kloner inneholdende IFN- β genet. En slik klon ble betegnet M13- β 1 og ble anvendt for å danne enkelttrådet fag DNA som skulle virke som templat for sete-spesifikk mutagenese.

Den nødvendige mutasjonen ble oppnådd ved fremstilling av en syntetisk
 10 oligonukleotidprimer hvor sekvensen: GCAATTTTCAGAGTCAG (SEQ ID NO: 3) er identisk med en 17 nukleotidsekvens i senstråden til IFN- β rundt regionen til kodon 17 i stedet for en enkeltbase par feilparring. Denne feilparringen ved nukleotid 12 til primeren erstattet A med nativ T og resulterte i erstatning av serin med cystein ved aminosyreposisjon 17. Basesubstitusjonen dannet også et nytt HinFI sete som letter
 15 deteksjon av serin-17 mutasjonen.

Hybridisering av syntetisk primer til fag DNA ble etterfulgt av primerekstensjon ved anvendelse av DNA polymerase I Klenow fragmentet for å danne dobbelttrådet DNA (RF) som ble anvendt for å transformere kompetente celler til E. coli stammen JM103.
 20 Transformerte E. coli kolonier ga enkelttrådede fagavkom hvor DNA koder enten for den muterte IFN- β _{Ser17} sekvensen, eller det native humane IFN- β polypeptidet. Seleksjon for fagavkom inneholdende mutert IFN- β gen ble utført ved anvendelse av en ³²P-merket form av ovennevnte syntetisk primer som en probe. Proben var fullstendig komplementær med DNA regionen inneholdende Cys₁₇ til Ser₁₇ mutasjonen, og
 25 hybridiserte derfor mest sterkt til fag DNA inneholdende mutasjon. En fagklon som hybridiserte til proben ble betegnet M13-SY2501; og deteksjon av det nye HinFI restriksjonssetet i denne klonen indikerte også tilstedeværelse av korrekt enkeltbase mutasjon. Dideokseysekvensering av enkelttråd formen av M13-SY2501 bekreftet at TGT Cys kodonet ble omdannet til et AGT Ser kodon.

30 Mutert IFN- β gen ble tatt ut fra fag M13-SY2501 RF DNA ved spaltning med HindIII og XhoII. Plasmid ptrp3 inneholdende E. coli trp promoteren ble spaltet med HindIII og BamHI, som fjernet en del av DNA like 3' for trp promoteren. Dette inaktiverte plasmid genet for tetracyklin resistens. IFN- β Ser₁₇ fragmentet ble deretter ligert inn i HindIII og
 35 BamHI setet til ptrp3 med T4 DNA ligase, og ligert DNA ble transformert inn i E. coli stamme MM294.

Plasmid pSy2501 ble transformert inn i en kompetente subvariant av *E. coli* stamme MM294 betegnet MM294-1 og ekspresjon av IFN- β_{ser17} ble verifisert. Prøver av transformerte celler ble deponert i Cetus Master Culture Collection and the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, under ATCC nr. 39517.

5

Som beskrevet er IFN- β_{ser17} genet under kontroll av en trp promoter og er tilstede i *E. coli* som et multikopi plasmid. Ekspresjon av genet blir bestemt av det intracellulære nivået av tryptofan. Molekyler av denne aminosyren danner komplekser med det intracellulære trp reseptorproteinet og dette komplekset blir bundet til operator regionen av trp promoter/operator, og forhindrer IFN- β_{ser17} gentranskripsjon. Nærværet av en intracellulær kilde av tryptofan blir IFN- β_{ser17} produksjonen hemmet. I løpet av celleveksten blir ekstracellulært tryptofan forbrukt og dets konsentrasjon faller. På grunn av at raten for tryptofan forbruk er proporsjonal med mengden av celleveksten, kan celletettheten hvorved tryptofan er fullstendig konsumert bli forutbestemt. Ved dette tidspunktet blir promoter/operator regionen befridd fra trp repressor/tryptofan kompleks og RNA polymerase har evne til å transkribere IFN- β_{ser17} genet. Klonet trp promoter innbefatter en ribosom bindingssete sekvens slik at transkribert IFN- β_{ser17} mRNA blir translatert av *E. coli* ribosomer. På grunn av at det samme trp promotersystemet også kontrollerer ekspresjonen av proteinet nødvendig for biosyntese av tryptofan kan cellene opprettholde en tilstrekkelig tilførsel av tryptofan selv uten en ekstracellulær kilde.

Plasmid ptrp3 ble dannet ved subkloning av *E. coli* trp promoteren fra plasmid pVV1 som en reparert (butt-endet) HhaI-TaqI delfragment på 100 bp. Det ble skutt inn i de reparerte (butt-endede) EcoRI-ClaI setene til pBR322 og regenererte både EcoRI og ClaI setene.

Stammen anvendt for produksjon av IFN- β_{ser17} er en *E. coli* K12 stamme kjent som MM294-1 som ble opprinnelig oppnådd fra stammen MM294. Meselson 1 har beskrevet MM294, også betegnet 1100.293, og identifiserte det som om det manglet et enzym som ødelegger fremmed DNA, et karaktertrekk som gjør stammen nyttig for transformasjon. Stammen har ingen spesielle næringsmessige krav unntatt tiamin og muliggjør at den blir dyrket hurtig på tiamin-supplementert minimalmedium i fermentorer.

35

Variant MM-294 ble isolert fra en IFN- β produserende klon av MM294 som var blitt transformert med IFN- β plasmid pSY201 og er forskjellig fra MM294 i

ekspresjonsnivået til IFN- β genet. pSY2101 plasmidet uttrykte IFN- β i høyere nivåer i denne kulturen enn i andre MM294 kloner. Det var nødvendig å fjerne pSY2101 plasmidet som kodet for det native humane IFN- β polypeptidet med Cys₁₇. Bakteriet ble leget for pSY2101 plasmidet ved dyrking under uttrykkende betingelser og replika
 5 utplatning, og selektering for kolonier som hadde mistet antibiotika resistens. Den isolerte verten ble betegnet MM294-1.

Kulturer av pSY2101 og p β 1trp, som innbefatter avkom derav, ble dyrket opp til en optisk tetthet (OD₆₀₀) på 1.0. Cellefrie ekstrakter ble dannet og mengden av IFN- β
 10 antiviral aktivitet analysert på GM2767 celler i en mikrotiteranalyse. Ekstraktene av klon pSY2501 utviser tre til ti ganger høyere aktivitet enn p β 1trp (tabell 1), og dette indikerer at klonen pSY2501 enten syntetiserte mer protein utvisende IFN- β aktivitet eller at proteinet som blir dannet hadde en høyere spesifikk aktivitet.

15 Det isolerte produktet ble analysert for nativ, human IFN- β aktivitet ved anvendelse av en analyse basert på viral beskyttelse. Prosedyren ble utført i mikrotiterskåler. Først ble 50 μ l minimal essensielt medium tilsatt til hver brønn og 25 μ l av prøven ble plassert i den første brønnen, og 1:3 volumfortynninger ble dannet i serie inn i de følgende brønnene. Vesikulær stomatitis virus, human fibroblast cellelinje GM-2767 og referanse
 20 IFN- β kontroller ble innbefattet på hver skål. Anvendt referanse IFN- β var 100 enheter pr ml. Skålene ble deretter bestrålt med UV lys i 10 minutter. Etter bestrålingen ble 10 μ l av celsuspensjonen ($1,2 \times 10^5$ celler/ml) tilsatt til hver brønn og brettene ble inkubert i 18-24 timer. En virusoppløsning ved en plakk-dannende enhet pr celle ble tilsatt til hver brønn unntatt cellekontrollen. Brettene ble deretter inkubert helt til
 25 viruskontrollen viste 100% (CPE). Dette oppsto normalt 18-24 timer etter tilsetning av virusoppløsningen. Analyseresultatene ble vurdert i relasjon til beliggenheten av 50% CPE brønnen til referanse IFN- β kontrollen. Fra dette punktet ble interferontitert til alle prøvene på skålen bestemt.

30 IFN- β polypeptidet, med Ser₁₇ substitusjon, ble også sammenlignet når det gjelder antiviral aktivitet med nativ, human IFN- β . Inhibisjon av vesikulær stomatitis virusreplikasjon i diploid foreskin fibroblast (HS27F) kunne ikke skjernes fra det til det naturlige molekylet. Inhibisjon av herpes simplex virus type 1 i HS27F fibroblaster med naturlige og mutante proteiner var sammenlignbare. Denne prosedyren og resultatene er
 35 beskrevet i Mark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-5666 (1984).

Antiproliferasjonsaktivitet av IFN- β polypeptid, ser17 substitusjon, for sammenhengende cellelinje ble sammenlignet med nativt, humant IFN- β . T24 celler avledet fra overgangs celle carcinoma ble behandlet med 200 enheter/ml av proteinene. Cellevekst ble inhibert signifikant. ($p > 0.2$) av begge proteinene. Denne prosedyren og resultatene ble beskrevet i Mark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-5666 (1984).

Evnen som IFN- β polypeptid, ser17 substitusjon, har til å stimulere naturlig drepe (NK) celle (spontan cellemediert cytotoxicitet) aktivitet ble testet. IFN- β polypeptidet ble testet med to celletyper: (1) Ficoll-hypakk separerte perifere humane mononukleære celler (PMC); eller (2) NK-anrikede lymfocyt preparater tappet for monocytter ved plastisk adhesjon og OKT3-positive T celler ved behandling med OKT3 antistoff pluss komplement.

Cellene ble inkubert over natt i vekstmedium inneholdende forskjellige konsentrasjoner IFN- β polypeptid, ser17 substitusjon. ^{51}CR -merkede målceller ble inkubert med effektorcellene i 2-4 timer. Effektorcelle til målcelle forholdet var 50:1. NK celle cytotoxiciteten ble bestemt ved måling av mengde markør frigjort i mediet. Denne prosedyren og resultatene ble beskrevet i Mark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-5666 (1984).

Eksempel 2: Kontroll eksperiment

Dette eksperimentet er relatert til fermentasjon av en celle med evne til å produsere IFN- β polypeptid under betingelser med høy kalium og natriumkation konsentrasjoner, og glukose som effektiv ikke-begrensende energikilde. Cellene ble dyrket ved 37°C og pH 6,8 med KOH som et titreringsmiddel.

E. coli stamme MM294-1 cellene transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, ble dyrket i følgende medium:

	<u>Forbindelse</u>	<u>g/L vann</u>	<u>8L</u>
	kaliumfosfat (monobasisk).....	2,94	
	ammoniumsulfat.....	9,52	
	natriumcitrat.....	0,441	
5	magnesiumsulfat (heptahydrat).....	0,492	
	jernsulfat (heptahydrat).....	0,0278	
	mangansulfat (monohydrat).....	0,00508	
	sinksulfat (heptahydrat).....	0,00864	
	kobbersulfat (pentahydrat).....	0,00025	
10	tryptofan.....	0,07	
	thiamin.....	0,02	
	glukose.....	50,0	

Cellene ble opprettholdt ved pH 6,8 i løpet av fermenteringen ved anvendelse av kaliumhydroksid som et titreringsmiddel. Cellene ble videre dyrket ved 37°C ved 40% oppløst oksygen.

En typisk fermenteringskjøring som følger disse prosedyrene produserte et gjennomsnitt på omtrent 350 ng/l IFN- β polypeptid. Et gjennomsnitt på omtrent 5% av totalt celleprotein var IFN- β polypeptidet. IFN- β polypeptidkonsentrasjonen ble bestemt ved SDS-PAGE analyse med en IFN- β polypeptidstandard. Totalt proteininnhold ble analysert ved anvendelse av en standard Lowry protokoll.

25 Eksempel 3: Effekt av kaliumkonsentrasjon på cellevekst og IFN- β polypeptidproduksjon

Disse fermentor eksperimentene viste at celleveksten og produksjon av celler med evne til å produsere IFN- β polypeptid er begrenset av konsentrasjonene til K⁺ kationene.

30 E. coli, stamme MM294 celler transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, ble dyrket i basalmedium, nedenfor, med varierende konsentrasjoner kaliumkationer med en bestemt konsentrasjon av natriumkationer.

Cellene ble dyrket i et av tre medier beskrevet nedenfor:

~ 40 mM kalium kation medium

- 4,4 mM kaliumcitrat
- 26,8 mM KH_2PO_4
- 5 66,8 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 33,2 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- 10 mM MgSO_4
- 2 g/L glukose
- 20 g/L glyserol
- 10 140 mg/L tryptofan
- 24 mg/L thiamin
- 4,7 mL/L BTM (sporelementer)

15 ~75 mM kalium kation medium

- 4,4 mM kaliumcitrat
- 35 mM KH_2PO_4
- 72 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 5 mM MgSO_4
- 20 2 g/L glukose
- 20 g/L glyserol
- 30 mM KCl
- 70 mg/L tryptofan
- 24 mg/L thiamin
- 25 50 mg/L ampicillin
- 4,7 mL/L BTM (sporelementer)

5 mM MgSO_4 og 15 mM KH_2PO_4 ble tilsatt ved 40 OD₆₈₀.

30

~120 mM kalium kation medium

- 4,4 mM kaliumcitrat
- 35 mM KH_2PO_4
- 72 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 35 5 mM MgSO_4
- 2 g/L glukose
- 20 g/L glyserol

60 mM KCl
 70 mg/L tryptofan
 24 mg/L thiamin
 4,7 mL/L BTM (sporelementer)

5

5 mM MgSO₄, 15 mM KH₂PO₄ og 40 mM (NH₄)₂SO₄ ble tilsatt ved 32 OD₆₈₀.

10 Ti ml polypropylenglykol antiskum ble tilsatt og fermentoren ble inokulert med omtrent 10 mg (tørrvekt) celler.

15 Fermenteringsmediet ble opprettholdt ved en pH på 5,7 med 7,4 MH₄OH. 50% (v/v) glyserol ble tilført ved et 3,5:1 forhold med ammoniumhydroksid. Det opprinnelige glyserolvolumet i foringsreservoaret skal være 150 ml/L fermentor opparbeidningsvolum. Temperaturen ble opprettholdt ved 37°C. Cellene ble høstet 7 timer etter at de nådde en optisk tetthet på 16 OD₆₈₀ enheter.

20 Hver kultur inneholdt en av følgende omtrentlige konsentrasjoner av kaliumkationer: 40 mM, 75 mM og 120 mM. De resulterende vekstratene og IFN-β polypeptidproduksjonsratene til hver kultur er vist i figurene 1 og 2. Ved 23,5 timer nådde 75 mM kulturen en optisk tetthet (OD₆₈₀) på omtrent 85 enheter sammenlignet med omtrent 35 enheter, mer enn en to ganger forskjell, enn 120 mM kulturen.

25 Til tross for at 75 mM kulturen vokste til en høyere celletetthet enn 40 mM kulturen produserte 40 mM kulturen omtrent 2000 µg/ml IFN-β polypeptidet i kontrast til 75 mM kulturen som bare produserte noe mindre enn 1200 µg/ml. Produksjon av IFN-β polypeptidet økte omtrent 60% når 40 mM K⁺ ble anvendt i stedet for 75 mM K⁺. 120 mM kulturen produserte omtrent ikke noe IFN-β polypeptid.

30 Produksjonsnivåene til IFN-β polypeptidet ble målt ved SDS-PAGE analyser farvet med Coomassie.

35 Eksempel 4: Effekt av kalium og natriumkationer på celleveksten og IFN-β polypeptidproduksjon

Følgende risteflaske eksperimenter demonstrerte at celler med evne til å produsere IFN-β polypeptider er følsomme for kalium- og natriumkation konsentrasjonen.

E. coli stammen MM294 celler transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, ble dyrket i basalmedium, nedenfor, med varierende mengder kalium- og natriumkationer tilsatt.

5

Følgende basalmedium ble anvendt for kalium/natriumkation eksperimentene:

- 4,4 mM ammoniumcitrat
- 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 10 35 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- 6 mM MgSO_4
- 5 g/L glyserol
- 24 mg/L thiamin
- 4,6 mL/L BTM* (sporelementer)
- 15 50 mM MES buffer

* Komponenter av BTM er som beskrevet i eksempel 2.

- Natrium- og kaliumkationene ble tilsatt som KCl og NaCl til individuelle flasker til
- 20 ønsket konsentrasjon.

- Cellene ble dyrket i en fermentor helt til eksponensiell vekstfase i definert medium inneholdende tryptofan. Cellene ble deretter inokulert ved ønsket celletetthet i ovennevnte basalmedium med ønsket konsentrasjon av kalium- og natriumkationer.
- 25 Dette mediet ble tilsatt til steriliserte risteflasker.

- Hver kultur inneholdt en av følgende konsentrasjoner kalium- og natriumsalter, 40 mM $\text{K}^+ / 0 \text{ mM Na}^+$, 30 mM $\text{K}^+ / 10 \text{ mM Na}^+$, 20 mM $\text{K}^+ / 20 \text{ mM Na}^+$, 10 mM $\text{K}^+ / 30 \text{ mM Na}^+$, 0 mM $\text{K}^+ / 40 \text{ mM Na}^+$. Den resulterende IFN- β polypeptid produksjonsraten til
- 30 hver kultur er vist i figur 3. Kulturen uten K^+ kationer og 40 mM Na^+ produserte omtrent 50 μg IFN- β polypeptid pr mg totalt celleprotein. Kulturen med 40 mM $\text{K}^+ / 0 \text{ mM Na}^+$ produserte omtrent 90 μg IFN- β polypeptid pr mg totalt celleprotein. Dette er omtrent en 80% forbedring i utbyttet.

- 35 IFN- β polypeptidkonsentrasjonen ble målt ved ELISA. Total proteinkonsentrasjon ble analysert ved anvendelse av en BCA analyse, Pierce Chemical. Celletettheten ble målt ved anvendelse av Klett enheter.

Eksempel 5: Effekt av pH på celleveksten etter induksjon av IFN- β polypeptidproduksjon

- 5 Disse risteflaske eksperimentene bestemte at celleveksten etter induksjon av IFN- β produksjonen er begrenset av høy pH.

E. coli, stamme mM294-1 celler transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, ble dyrket i basalmedium, nedenfor, titrert til varierende pH.

10

I disse eksperimentene ble følgende basalmedium anvendt og justert til ønsket pH med enten NH_4OH eller HCl :

- 12 mM NH_4Cl
 15 26,3 mM KH_2PO_4
 33,7 mM Na_2HPO_4
 10,8 mM K_2SO_4
 0,24 mM MgSO_4
 5 g/L glyserol
 20 3,6 μM ZnSO_4
 3,6 μM MnSO_4
 0,12 μM CuSO_4
 50 mM MES buffer

- 25 Cellene ble dyrket i pre-induksjonsmedium inneholdende tryptofan til eksponensiell vekstfase. I løpet av pre-induksjonen ble kulturene opprettholdt ved forskjellige ønskede pH verdier. Cellene ble deretter separert fra mediet ved sentrifugering og deretter resuspendert i mediet med ønsket pH. Temperaturen ble opprettholdt ved 37°C. Resulterende vekstrater før og etter induksjon er vist i figurene 4 og 5. Vekstratene
- 30 varierte ikke signifikant før induksjonen. Den endelige celletettheten til høyest pH testet, 6,6, var omtrent 35. Endelige celletetthet økte når pH til kulturene falt. Høyest celletetthet på omtrent 110 fremkom i pH 5,4 kulturen. Dette er mer enn en fire ganger økning i celleveksten. Ved pH 5,1 falt cellevekstraten derimot.

35

Eksempel 6: Effekt av forskjellige ikke-begrensende energikilder på IFN- β polypeptidproduksjonen

Disse eksperimentene viste at anvendelse av glyserol som effektiv ikke-begrensende energikilde kan øke IFN- β polypeptidproduksjonsraten.

5

E. coli, stamme MM294 celler transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, ble dyrket i medium, nedenfor, med enten glyserol, fruktose eller glukose som effektiv, ikke-begrensende energikilde.

10 Glukosemedium

6,6 mM kaliumcitrat

35 mM KH_2PO_4

36 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5 mM MgSO_4

15 70 mg/L tryptofan

24 mg/L thiamin

50 mg/L ampicillin

4,7 mL/L BTM (sporelementer)

20 g/L glukose

20 4 mM MgSO_4 tilsatt ved 37 OD 680

Glyserol og fruktosemedium

4,4 mM kaliumcitrat

35 mM KH_2PO_4

25 72 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5 mM MgSO_4

2 g/L glukose

20 g/L glyserol

30 mM KCl

30 70 mg/L tryptofan

24 mg/L thiamin

50 mg/K ampicillin

4,7 mL/L BTM (sporelementer)

35 Til fruktose kulturen ble det ved 40 OD₆₈₀ tilsatt 5 mM MgSO_4 , 15 mM KH_2PO_4 og 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Til glyserolkulturen ble 5 mM MgSO_4 og 15 mM KH_2PO_4 tilsatt ved 40 OD₆₈₀.

- Til hver kultur ble 10 ml PPG antiskum tilsatt og fermentoren ble inokulert med 10-20 mg (tørrvekt) celler. Fermenteringsmediet ble opprettholdt ved en pH på 5,7 med 7,4 N NH_4OH med unntagelse av at glukose tilført medium ble opprettholdt ved pH 5,4. 50% (v/v) glyserol, fruktose eller glukose blir tilført i et 3,5:1 forhold med ammoniumhydroksid. Temperaturen ble opprettholdt ved 37°C. Cellene ble høstet ved forskjellige tidspunkter i løpet av fermenteringen.
- 10 Det ble nesten ikke detektert IFN- β polypeptidproduksjon for fruktosefermentasjon. Glyserol fermentasjon produserte 1,6 mg/L IFN- β polypeptid sammenlignet med glukosefermentasjonen som bare produserte 0,6 mg/L. Dette er omtrent en 2,6 ganger økning. Resultatene er vist i figur 6.
- 15 IFN- β polypeptidkonsentrasjonen ble øket ifølge SDS-PAGE analyser med en IFN- β polypeptidstandard.

Eksempel 7: Effekt av temperatur på IFN- β polypeptidproduksjonen

- 20 Disse fermentor eksperimentene viste at IFN- β polypeptidproduksjonsratene økte når temperaturen økte.

E. coli, stamme MM294 celler transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, ble dyrket i mediet nedenfor ved varierende temperaturer:

- 25
- 4,4 mM kaliumcitrat
 - 26,8 mM KH_2PO_4
 - 25,9 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - 48,2 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
 - 30 10 mM MgSO_4
 - 2 g/L glukose
 - 20 g/L glyserol
 - 140 mg/L tryptofan
 - 24 mg/L thiamin
 - 35 4,7 mL/L BTM (sporelementer)

Til hver fermentor ble det tilsatt 10 ml PPG antiskum (fremstiller) og fermentoren ble inokulert med 10 - 20 mg (tørrvekt) celler.

Fermentasjonsmediet ble opprettholdt ved en pH på 5,7 med 7,4 NH₄OH. 50% (v/v) glyserol blir tilført ved et 3,5:1 forhold med ammoniumhydroksid. Temperaturen ble opprettholdt ved 34 eller 37 eller 40°C.

Vekstratene til forskjellige kulturer varierte ikke meget. Når temperaturen ble øket ble utbyttet av IFN-β polypeptid sammenlignet med totalt celleprotein også øket. Ved 34°C var 8,5% protein produsert IFN-β polypeptid. Ved 37°C og 40°C, var 10,5% og 13,5% av totalt protein produsert IFN-β polypeptid. I kontrolleksperimentet beskrevet i eksempel 2 var bare 5,1% av totalprotein IFN-β polypeptid.

IFN-β polypeptid konsentrasjonen ble målt ved SDS-PAGE analyser med en IFN-β polypeptidstandard. Total proteinkonsentrasjon ble analysert ved BCA. Dataene er angitt i figur 7.

Eksempel 8: Sluttoppskrift og dyrkningsbetingelser

Følgende fermenteringsprosedyre innkorporerte lave kalium og natriumkation konsentrasjoner, lav pH, høy temperatur og glyserol som effektiv ikke-begrensende energikilde. Gjennomsnittlig IFN-β polypeptid produksjon fra denne fermenteringsprosedyren er 5-6 ganger bedre enn produksjonen av prosedyren beskrevet i eksempel 2.

E. coli stamme, MM294-1 celler transformert med pSY2501, beskrevet i eksempel 1, var celler anvendt for denne fermenteringsprosedyren.

For en 10L fermentor ble først 900 ml 50% (v/v) glyserol tilsatt til en 2L beholder og brakt til et endelig volum på omtrent 1,2 L med deionisert (DI) vann. Til 2L beholderen ble følgende komponenter tilsatt i angitte rekkefølge. Hver komponent ble fullstendig oppløst før tilsetning av den andre.

Kaliumcitrat (FW=306,4).....	11,5 g
(12,1 g monohydrat)	
BTM.....	40 ml
glukose.....	17 g
KH ₂ PO ₄ (FW=136,1).....	31,0 g

	NH ₄ H ₂ PO ₄ (FW = 115).....	47,1 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (FW=132,1).....	29,1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (FW = 246,5).....	21,0 g
	thiamin·HCl.....	204 mg
5	L-tryptofan.....	1,19 g

Oppløsningen ble brakt til et sluttvolum på 1,5 L og steril filtrert. BTM er en sporelementblanding. Sammensetning av BTM er som følger:

	100 mM FeCl ₃
10	9,6 mM ZnCl ₂
	8,4 nM CoCl ₂
	8,3 mM Na ₂ MoO ₄
	6,8 mM CaCl ₂
	7,4 mM CuCl ₂
15	2,5 mM H ₃ BO ₃

i 10% HCl.

Denne oppløsningen ble tilsatt til en sterilisert fermentor inneholdende omtrent 7,0 L DI vann. Deretter ble oppløsningen i fermentoren brakt til et sluttvolum på 9,0 L med DI vann. 10 ml PPG antiskum ble tilsatt og fermentoren ble inokulert med 10-20 mg (tørrvekt) celler.

Fermenteringsmediet ble opprettholdt ved en pH på 5,7 med 7,4 N NH₄OH. 50% (v/v) glyserol ble tilført ved et 3,5:1 forhold med ammoniumhydroksid. Leucin og isoleucin ble også tilført til vertscellene med glyserol og base. Disse aminosyrene ble tilført ved tilsetning av 26,4 g isoleucin og 19,7 g leucin til hver 700 mL 7,4 N NH₄OH. Denne blandingen av base og aminosyrer ble anvendt for å opprettholde pH til kulturmediet. Opprinnelig glyserolvolum i føringsreservoaret bør være 1500 ml. Temperaturen ble opprettholdt ved 39,5°C. Cellene ble høstet 7 timer etter oppnåelse av en optisk tetthet på 16 OD₆₈₀ enheter.

En typisk fermenteringskjøring ifølge disse prosedyrene produserte et gjennomsnitt på ~ 2,0 - 2,5 g/L IFN-β polypeptid sammenlignet med kontrollfermenteringen, beskrevet i eksempel 2, som produserte gjennomsnittlig 0,35 g/L. Disse fermenteringsbetingelsene produserte over 5-6 ganger mer IFN-β polypeptid enn kontrollfermenteringsbetingelsene. Et gjennomsnitt på ~11,5% av totalt celleprotein ved

anvendelse av disse prosedyrene er IFN- β polypeptidet sammenlignet med et gjennomsnitt på ca 5,1% i kontrollfermenteringen. IFN- β polypeptidet produsert ifølge denne prosedyren har omtrent over 2 ganger økning i renhet.

5 Deponeringsinformasjon:

følgende materialer ble deponert til American Type Culture Collection:

<u>Cellelinje</u>	<u>Deponeringsdata</u>	<u>aksesjonsnr.</u>
E. coli, stamme MM294-1		
10 transformert med pSY2501	10 november	39517

Ovennevnte materialer er blitt deponert til American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, under angitte aksesjonsnr. Denne deponeringen vil bli opprettholdt under betingelsene i "Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of
15 Microorganisms for purposes of Patent Procedure". Deponeringene vil bli opprettholdt i en periode på 30 år etter utstedt patent, eller i løpet av tiden som patentet er i kraft, eller det lengste av disse to. Når patent blir meddelt vil deponeringene være tilgjengelig for offentligheten fra ATCC uten begrensning.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

- (i) APPLICANT: Dorin, Glenn
- 5 (ii) TITLE OF INVENTION: Bacterial Fermentation to Produce
Interferon-Beta Polypeptides
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
- 10 (A) ADDRESSEE: Chiron Corporation
(B) STREET: 4560 Horton Street
(C) CITY: Emeryville
(D) STATE: California
(E) COUNTRY: United States
(F) ZIP: 94608
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- 15 (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
- 20 (A) NAME: Chung, Ling-Fong
(B) REGISTRATION NUMBER: 36,482
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 0970.001
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
- (A) TELEPHONE: (510) 601-2704
(B) TELEFAX: (510) 655-3542

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 1:

- (i) SEVENS KARAKTERTREKK:
- 25 (A) LENGDE: 166 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅDTYPE: enkel
(D) TOPOLOGI: lineær
- 30 (ii) MOLEKYLTTYPE: protein
- (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:
- 35

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Leu Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

20

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEVENS KARAKTERTREKK:

- 25 (A) LENGDE: 13 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅDTYPE: enkel
 (D) TOPOLOGI: lineær

30 (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2:

TATGAGCTAC AAC

13

35

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEVENS KARAKTERTREKK:**(A) LENGDE: 17 basepar****(B) TYPE: nukleinsyre****(C) TRÅDTYPE: enkel****5 (D) TOPOLOGI: lineær****(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)****(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 4:**

10

GCAATTTTCA GAGTCAG

17

15

20

P a t e n t k r a v

25 1.

Fremgangsmåte for fremstilling av interferon- β (IFN- β) i en Escherichia coli-vertscelle, karakterisert ved at den omfatter:

- (a) tilveiebringning av en E. coli-vertscelle transformert med en vektor omfattende en sekvens som koder for et IFN- β -polypeptid; og
- 30 (b) dyrking av cellen under betingelser som effektivt induserer produksjonen av IFN- β polypeptid, i et medium som omfatter ikke høyere enn omtrent 93,2 mM kaliumioner og ikke høyere enn omtrent 100 μ M natriumioner, der pH i mediet opprettholdes mellom omtrent 5,4 og 6,0.

35 2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, der kaliumkonsentrasjonen ikke er høyere enn 75 mM.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t kaliumkationkonsentrasjonen ikke er høyere enn omtrent 40 mM.

5 4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t kaliumkationekonsentrasjonen ikke er mindre enn ca. 10 mM.

5.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t kaliumkationekonsentrasjonen ikke er større enn ca. 40 mM og ikke mindre enn ca. 10 mM.

6.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t kationekonsentrasjonen ikke er høyere enn ca. 50 μ M.

7.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t mediet opprettholdes ved en pH mellom ca. 5,4 og ca. 5,7.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t mediet omfatter glyserol hvor mengden ikke begrenser den endelige tettheten.

25

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t mediet omfatter glyserol hvori mengden ikke begrenser den endelige tettheten.

30 10.

Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte glyserolkonsentrasjon er mellom omtrent 2 g/l og omtrent 100 g/l.

11.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t dyrkningsbetingelsene omfatter dyrking av cellen mellom omtrent 34°C og omtrent 42°C.

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at dyrkningsbetingelsene omfatter dyrking av cellen ved omtrent 39,5°C.

5 13.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at dyrkningsbetingelsene omfatter dyrking av cellen mellom omtrent 34°C og omtrent 42°C.

10 14.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediet videre omfatter en mengde glukose.

15.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyresekvensen til nevnte interferon- β polypeptid er SEQ ID NO: 1, i det aminosyre 17 er serin.

16.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at vertscellen er Escherichia coli, stamme MM294-1.

17.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at vektoren omfatter pSY2501 (ATCC aksesjonsnr. 39517).

18.

Sammensetning for produksjon av IFN- β polypeptid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

30 (a) en bakteriell celle med evne til IFN- β produksjon; og

(b) et dyrkningsmedium omfattende:

- (i) ikke mer enn omtrent 93,2 mM K^+ -kationer;
- (ii) ikke mer enn omtrent 100 μ M Na^+ kationer; og
- (iii) mellom omtrent 2 og omtrent 100 g/L glyserol,

35 der pH i dyrkningsmediet er mellom ca. 5,4 og ca. 5,7.

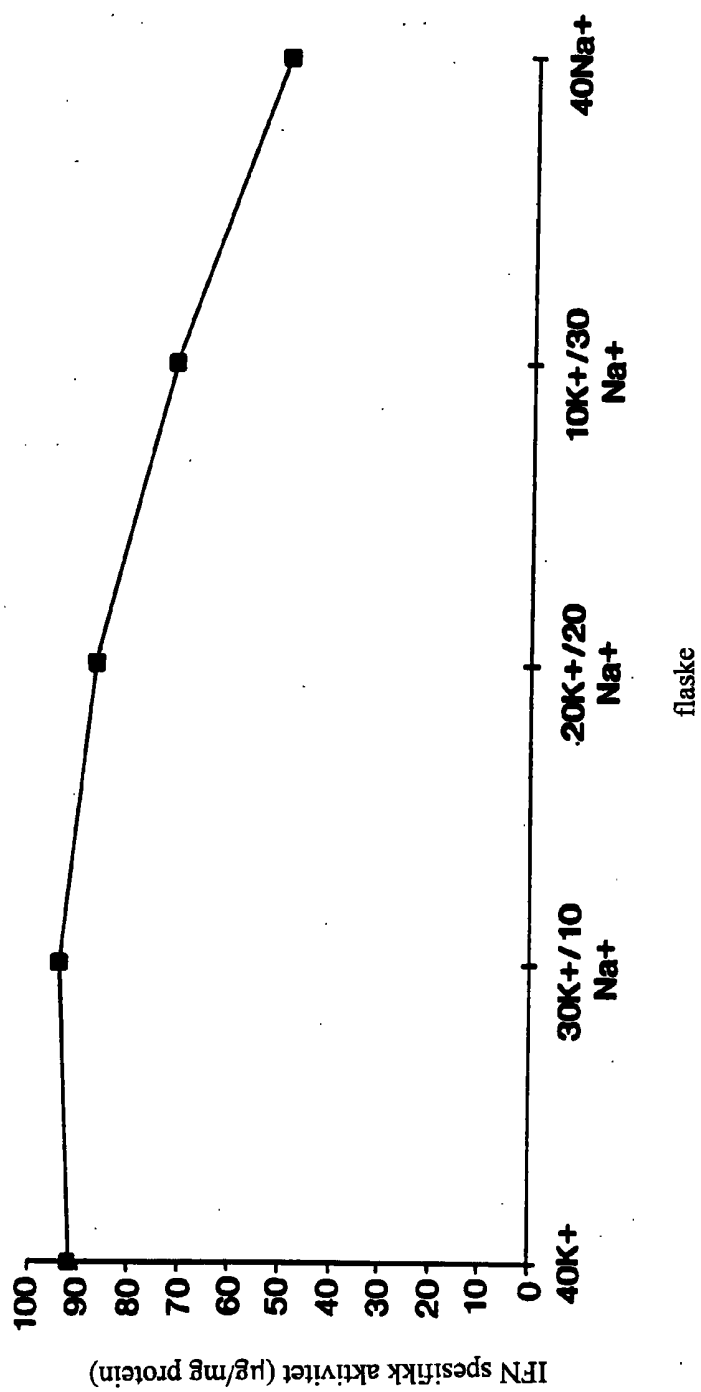
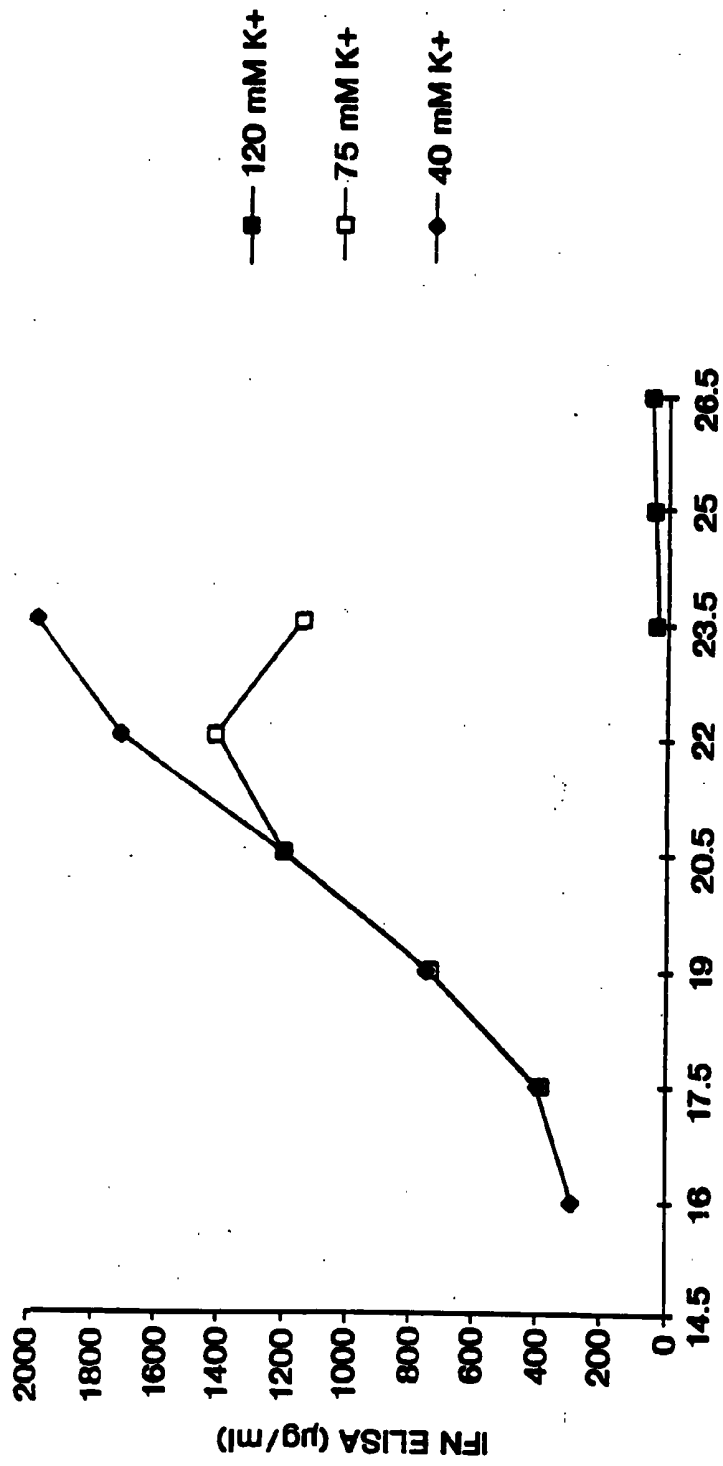


FIG. 1



Timer etter inokulasjon

FIG. 2

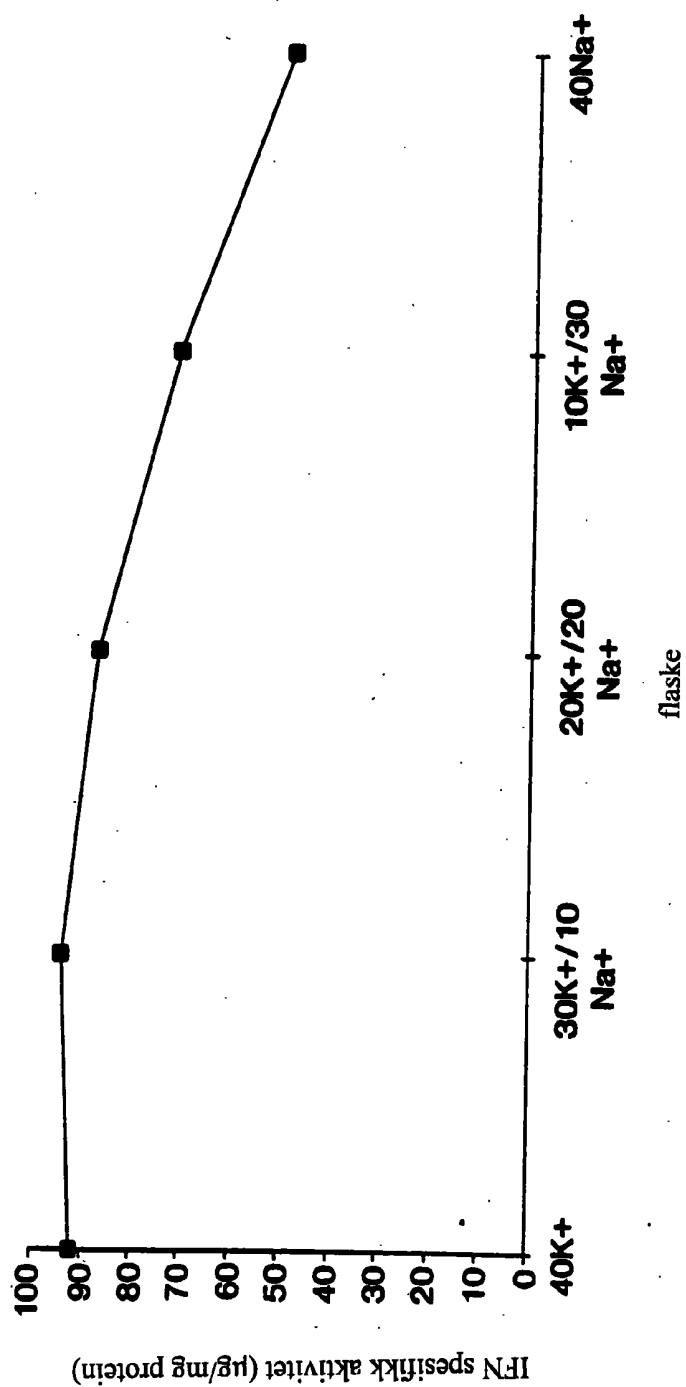
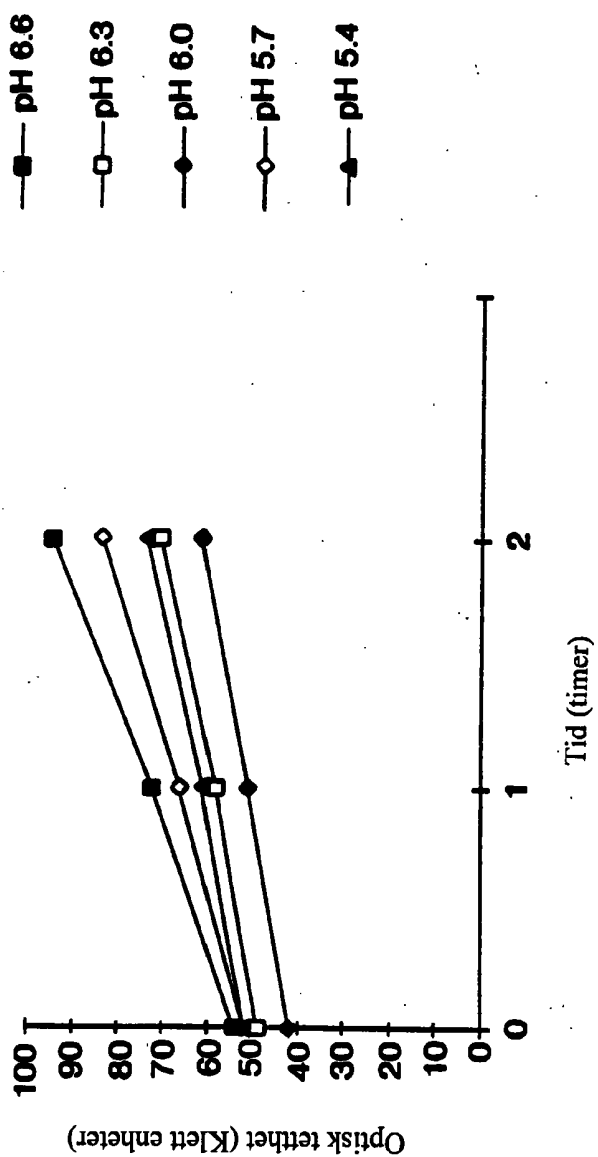


FIG. 3

**FIG. 4**

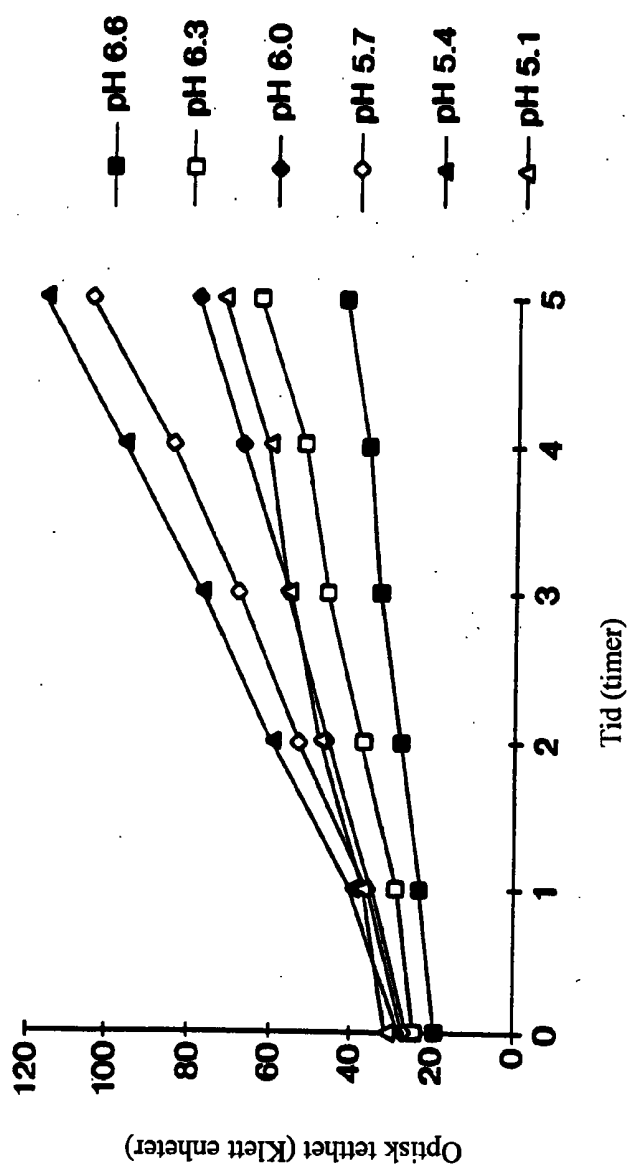


FIG. 5

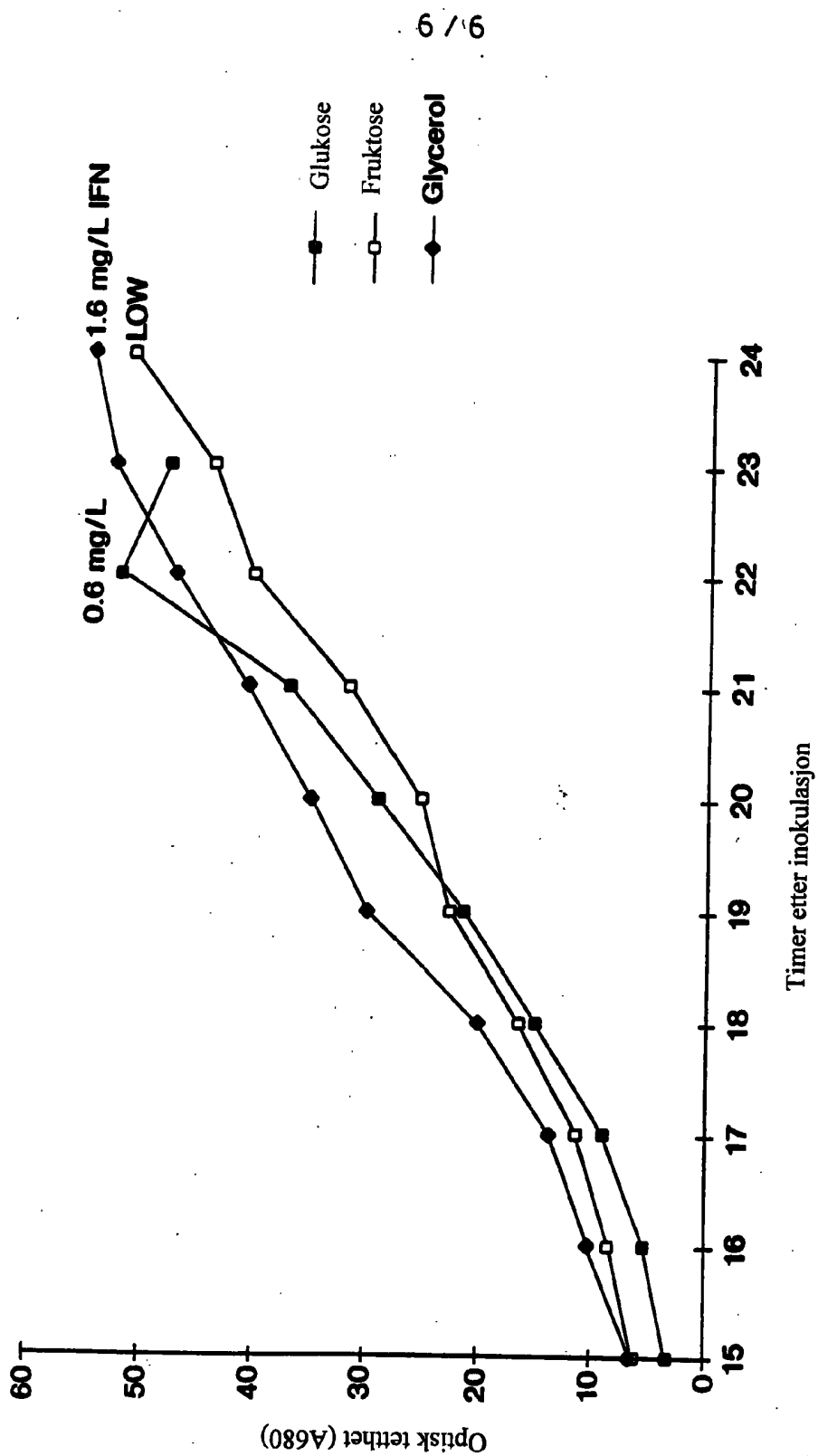


FIG. 6