
Octrooiraad



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8700397**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Zuivering van recombinant humaan-interleukine-1.**
- ⑤1 Int.Cl.: C12N 15/00.
- ⑦1 Aanvrager: F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft te Bazel,
Zwitserland.
- ⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8700397.
- ②2 Ingediend 17 februari 1987.
- ③2 Voorrang vanaf 18 februari 1986.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 830406 .
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 16 september 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Zuivering van recombinant humaan-interleukine-1

De uitvinding heeft betrekking op een microbieel bereid humaan-
5 interleukine-1 alsmede op een werkwijze voor het bereiden daarvan.

Twee genen, die voor de α - en de β -vorm van humaan-interleukine-1 coderen, zijn in de literatuur beschreven, bijvoorbeeld door March et al., Nature 315, 641-647 (1985). De Europese octrooiaanvraag 200.986 (gepubliceerd op 12 november 1986) beschrijft het klonen en de expres-
10 sie van recombinant humaan-interleukine-1, dat wil zeggen een humaan-interleukine-1, dat microbieel bereid is. Bij de daarin beschreven zuiveringswerkwijze treedt een probleem op op grond van de onoplosbaarheid van dit eiwit binnen de bacteriële gastheercellen. Aangenomen wordt, dat dit probleem kan worden toegeschreven aan de productie van grote
15 hoeveelheden eiwit in een omgeving, die blijkbaar niet geschikt is voor de juiste plooiing van het eiwit. De problemen bij de plooiing van het eiwit manifesteren zich door de vorming van insluitingen in de bacteriën. Deze ingesloten lichamen (inclusion bodies) konden slechts in sterk denaturerende agentia zoals ureum en guanidine-hydrochloride wor-
20 den opgelost.

De zuiveringswerkwijzen, waarbij deze sterk denaturerende agentia worden toegepast, leveren gezuiverd recombinant humaan-interleukine-1. Om redenen, die niet duidelijk zijn, echter mogelijk samenhangend met de plooiing van het eiwit in deze niet-biologische omgeving, over-
25 schrijdt het waargenomen specifieke activiteitsniveau van gezuiverde moleculen niet een waarde van 6×10^6 eenheden/mg. Derhalve lag aan de onderhavige uitvinding het doel ten grondslag, een zuiveringswerkwijze voor recombinant humaan-interleukine-1, in het bijzonder voor recombinant humaan-interleukine-1 α , te ontwikkelen, die de zuivering en
30 solubilisering van het gewenste eiwit in een biologisch verenigbaar buffersysteem mogelijk maakt en een produkt met een verhoogde specifieke activiteit oplevert.

De onderhavige uitvinding betreft een verbeterde werkwijze voor de bereiding van recombinant humaan-interleukine-1, in het bijzonder
35 humaan-interleukine-1 α , speciaal van humaan-interleukine-1 α met een aminozuurvolgorde volgens fig.1 als een in hoofdzaak homogeen eiwit, in hoofdzaak endotoxine-vrij met een verhoogde specifieke activiteit, in het bijzonder een specifieke activiteit van tenminste ongeveer
 5×10^7 eenheden/mg. Bovendien heeft de uitvinding betrekking op re-
40 combinant humaan-interleukine-1, dat volgens de aangegeven werkwijze

870 0397

wordt bereid, namelijk een humaan-interleukine-1, dat microbieel wordt bereid, in hoofdzaak endotoxine-vrij als een in hoofdzaak homogeen proteïne met een specifieke aktiviteit van tenminste ongeveer 5×10^7 eenheden/mg. Dit humaan-interleukine-1 kan als farmaceutisch middel gebruikt worden voor de behandeling en profylaxe van ziekten. Verder betreft de uitvinding farmaceutische preparaten, die dit humaan-interleukine-1 bevatten. Om redenen, die de deskundige duidelijk zullen zijn, kan het humaan-interleukine-1 volgens de onderhavige uitvinding een extra methioninerest aan het eindstandige stikstofatoom bevatten.

10 Een belangrijk aspekt van de onderhavige uitvinding berust op de verrassende ontdekking, dat een aanzienlijk van het in een bacteriële gastheer, bijvoorbeeld in *E. coli*, geëxprimeerde recombinant humaan-interleukine-1, in de oplosbare cytosolfraktie aanwezig is, ofschoon de specifieke aktiviteit in deze fraktie ver beneden die van met ureum ge-
15 extraheerde ingesloten lichamen ligt. Bovendien is het zo, dat humaan-interleukine-1 niet alleen in het cytosol aanwezig is, maar verrassenderwijs werd gevonden, dat het uit het cytosol door een eenvoudige twee- of eventueel drietrapskolomchromatografie kan worden gezuiverd.

Bij de eerste trap van de werkwijze volgens de uitvinding ver-
20 krijgt men een oplosbare celfraktie door openbreken van getransformeerde microbiële gastheercellen, die groeien onder omstandigheden, die de expressie van het ingevoerde gen voor humaan-interleukine-1 teweegbrachten en afscheiding van het onoplosbare celmateriaal met inbegrip van de ingesloten lichamen, waarin volgens de stand van de techniek het
25 grootste deel van het geëxprimeerde humaan-interleukine-1 (rHIL-1) aanwezig moet zijn.

Het ontsluiten van de cellen kan volgens algemeen bekende technieken tot stand worden gebracht, bijvoorbeeld door enzymatische afbraak, bijvoorbeeld door lysozym-behandeling, door fysische splitsing onder
30 toepassing van een kogelmolen of een soortgelijke inrichting, of bij voorkeur door behandeling met ultrageluid. Het afscheiden van het oplosbare cytosol van het onoplosbare celmateriaal wordt op de eenvoudigste wijze door centrifugeren, bijvoorbeeld bij $20.000 \times g$ gedurende ongeveer 30 minuten, bereikt. De bovenstaande vloeistof met de cytosol-
35 fraktie, die oplosbaar rHIL-1 bevat, wordt dan aan een gelfiltratie onderworpen, waarbij een gebufferde zoutoplossing voor het elueren wordt toegepast. Een voor deze werkwijzetrap geschikte kolom is een Sephacryl^(R) S-200 kolom (Pharmacia Feinchemikalien AB, Uppsala, Zweden).

40 De gel-chromatografie-frakties in de gebufferde zoutoplossing, bij

voorkeur in een met tris-HCl, pH 8,0 gebufferde NaCl-oplossing, die een eiwit-stabilisator zoals ethyleendiaminetetraazijnzuur (EDTA) kan bevatten, worden onderzocht. De gekombineerde biologisch actieve frakties worden met een verdere hoeveelheid gebufferde zoutoplossing verdund en
 5 in de tweede trap van de werkwijze volgens de uitvinding gebruikt.

Het onderzoeken van de chromatografische frakties kan met algemeen bekende methoden worden uitgevoerd. Een geschikte analysemethode is de thymocyten-proliferatie-analyse bij de muis (LAF-analyse), zoals beschreven door Mizel et al., J. Immunol., 120, 1497-1508 (1978).

10 De tweede werkwijzetrap omvat een ionenuitwisselingschromatografie, bij voorkeur over een DEAE-cellulose bevattende kolom, onder toepassing van een gradiënt van een toenemende zoutconcentratie in een gebufferde oplossing. Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm is deze gradiënt een 0-800 mM NaCl-gradiënt in 25 mM tris/HCl, pH 8,1 buffer.

15 Bij de zuivering op grote schaal worden na het centrifugeren voor het verwijderen van de brokstukken van de cellen de nucleïnezuren in de cytosolfractie door een streptomycine-sulfaat-precipitatie verwijderd. Een tiende van de volumehoeveelheid (van de bovenstaande vloeistof) van een 10% gew./vol. streptomycine-sulfaat-oplossing wordt toe-
 20 gevoegd. De pH wordt met 1N azijnzuur bij 6,2-6,4 gehouden. De suspensie wordt bij 20.000 x g gedurende 30 minuten gecentrifugeerd. De eiwitten in de resulterende oplossingen van de bovenstaande vloeistof worden geconcentreerd door toevoegen van ammoniumsulfaat, tot een verzadiging van 60%. De suspensie wordt bij 20.000 x g gedurende 30 minu-
 25 ten gecentrifugeerd en het resulterende sediment wordt opgelost in een minimaal volume van 25 mM tris/HCl, pH 8,0, 800 mM NaCl.

In enige gevallen, in het bijzonder bij het uitvoeren van de werkwijze op relatief grote schaal, kan de hoeveelheid endotoxine bij deze trap tot boven de toelaatbare grens verhoogd zijn. Dientengevolge kan
 30 eventueel een derde trap voor het verwijderen van het endotoxine worden toegepast. Algemeen bekende werkwijzen kunnen voor dit doel worden gebruikt, hoewel de voorkeur verdienende werkwijze volgens de onderhavige uitvinding een passeren van de oplossing (in een volumeverhouding van 1:1 verdund met 25 mM tris/HCl, pH 8,1) van de DEAE-kolom door een
 35 DetoxiGel^(R) (Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., Verenigde Staten van Amerika) -kolom omvat, volgens de aanwijzingen van de fabrikant.

Het gezuiverde humaan-interleukine-1 volgens de onderhavige uitvinding kan op bekende wijze als farmaceutisch middel worden toegepast
 40 om het immuunsysteem van een patiënt te stimuleren, bijvoorbeeld

doordat de immuun-respons op pathogenen wordt verbeterd, doordat het als vaccin-adjuvans werkzaam is en doordat het de afweer tegen neoplastische ziekten versterkt. Andere toepassingsmogelijkheden betreffen het bevorderen van de wondheling door stimulatie van de groei van de fibroblasten en de verbetering van de genezing van kritisch zieken, wat betreft eiwit ondervoede patiënten.

Het humaan-interleukine-1 volgens de onderhavige uitvinding kan voor de bovengenoemde klinische toepassingsgebieden aan mensen en warmbloedige zoogdieren worden toegediend. De toediening kan volgens elke professionele methode plaatsvinden, zoals door parenterale toediening, bijvoorbeeld intraveneus, subcutaan of intramusculair. Het zal duidelijk zijn, dat de benodigde dosis afhankelijk is van de specifieke omstandigheden, van de ernst van de ziekte, van de duur van de behandeling en van de toedieningsmethode. Een geschikte doseringsvorm voor de farmaceutische toepassing kan worden verkregen doordat steriel gefiltreerd, gelyofiliseerd humaan-interleukine-1 voor de toepassing op bekende wijze wordt samengesteld. De toevoeging van buffers, stabilisatoren, bacteriostatica en andere toevoegsels, die gewoonlijk in farmaceutische parenterale doseringsvormen worden toegepast, kan volgens de algemene technieken plaatsvinden.

In de volgende voorbeelden wordt de uitvinding nader toegelicht.

Voorbeeld I

E. Coli-cellen, getransformeerd met een expressievector, die voor recombinant humaan-interleukine-1 α (rHIL-1 α) codeert, werden gekweekt onder omstandigheden, die de expressie van het rHIL-1 α mogelijk maken. De cellen werden verzameld en bevroren. Voor het zuiveren van het rHIL-1 α werden de bevroren E. colicellen ontdood in 30 mM tris/HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (in een verhouding van 1:5 gew./vol.). De opnieuw gesuspendeerde cellen werden met een inrichting voor het kapotmaken van cellen, namelijk een "Branson Zellzertrümmerer 350" (Sonicator) ontsloten. De ontsloten cellen en "onoplosbaar" rHIL-1 α in de vorm van ingesloten lichamen werden door centrifugeren bij 20.000 x g verwijderd. De oplosbaar rHIL-1 α bevattende bovenstaande vloeistof werd op een Sephacryl^(R) S-200-kolom (fig.2) gebracht. De kolom werd met 30 mM tris/HCl (pH 8,0), 800 mM NaCl, 5 mM EDTA geëquilibreerd. De biologisch actieve frakties werden verenigd, in een verhouding van 1:3 (volume/volume) met 30 mM tris/HCl (pH 8,0) verdund en op DEAE-cellulose (anionen-uitwisselaar DE 53, Whatman Ltd.) onder toepassing van een lineaire gradiënt van 0-800 mM NaCl in 25 mM tris/HCl (pH 8,1) gechromatografeerd (fig.3). Meer dan 50% van de biologische activiteit werd

teruggewonnen bij een specifieke activiteit van $0,4$ tot $1,0 \times 10^7$ eenheden/mg eiwit. De zuiverheid van het eiwit werd door middel van SDS-polyacrylamide-gelelektroforese (SDS-PAGE) volgens Laemmli et al., Nature 227, 680-685 (1970), (fig.4), alsmede door middel van HPLC met omgekeerde fasen bevestigd. Na chromatografie met Sephacryl^(R) S-200 was het rHIL-1 α verontreinigd met 1000-2000 endotoxine-eenheden/ml, maar de DEAE-chromatografie bracht een vermindering van het endotoxine met 99% teweeg. De biologische activiteit bleek gedurende tenminste 3 maanden stabiel te zijn wanneer het eiwit bij 4°C bewaard werd.

Voorbeeld II

De bovengenoemde werkwijze werd op vergrote schaal uitgevoerd teneinde 32 mg nagenoeg zuiver rHIL-1 α te bereiden. 100 g celmassa werden met een zogenaamde Manton-Gaulin (Meth. Enzymology 22, 482-484 [1971]) ontsloten en het resulterende oplosbare produkt werd met streptomycinesulfaat en ammoniumsulfaat behandeld teneinde nucleïnezuren te verwijderen en de eiwitten te concentreren. Het resulterende, opnieuw gesolubiliseerde eiwit werd in een gebufferde zoutoplossing over een kolom met 10 l Sephacryl^(R) S-200 gechromatografeerd. Het gezuiverde materiaal werd vervolgens over een DEAE-cellulose bevattende kolom gechromatografeerd. Het eiwit bezat een zuiverheid van meer dan 95%, hetgeen door SDS-PAGE kon worden vastgesteld. De totale activiteit, die verkregen werd, bedroeg $1,6 \times 10^9$ eenheden met een gemiddelde specifieke activiteit van 5×10^7 eenheden/mg. In tegenstelling tot de eigenlijke pilotproef was dit materiaal echter enigszins met endotoxine verontreinigd (maximaal 500 endotoxine-eenheden/ml). Deze endotoxineverontreiniging kon gemakkelijk worden verwijderd doordat de eiwitoplossing werd geleid over een met DetoxiGel^(R) gepakte kolom, waarbij de aanwijzingen van de fabrikant gevolgd werden.

Beschrijving van de figuren:

Fig. 1 toont de aminozuursequentie van humaan-interleukine-1 α .

Fig. 2 toont een chromatogram van de gelfiltratie van E. coli-cytosol met oplosbaar rHIL-1 α op Sephacryl^(R) S-200. Het elueermiddel is 30 mM tris/HCL (ph 8,0), 800 mM NaCl. Bij een gedeelte van de hoeveelheid van de frakties werd door middel van LAF-analyse de interleukine-1-activiteit bepaald.

Fig. 3 toont een chromatogram van de DEAE-cellulose-chromatografie van de verenigde frakties van de Sephacryl^(R) S-200-kolom, die een interleukine-1-activiteit bezaten. rHIL-1 α werd met een zoutgradient van 0-800 mM NaCl in 25 mM tris/HCl (pH 8,1) geëluëerd. Monsters van

870 0397

elke fraktie werden door middel van LAF-analyse op biologische activiteit onderzocht.

Fig. 4 toont de zuivering van rHIL-1 α . Monsters van diverse trap-
pen van de zuivering van rHIL-1 α werden door middel van SDS-PAGE geana-
lyseerd.

(A) M: Grootte-markeringseiwitten; P: sediment na het centrifuge-
ren van de met ultrageluid behandelde celsuspensie; S: cytosolfraktie;
frakties 64 - 69 en frakties 70 - 77: frakties 64 tot frakties 77 van
de Sephacryl^(R) S-200 chromatografie afzonderlijk opgebracht (ge-
markeerd door |).

(B) M: Grootte-markeringseiwitten; O: verenigde frakties van de
Sephacryl^(R) S-200 kolomchromatografie; O*: verenigde frakties van
de Sephacryl^(R) S-200 kolomchromatografie 1:3 (vol./vol.) verdund
met 30 mM tris/HCl, pH 8,1; frakties 60 - 65 en frakties 66 - 73: frak-
ties 60 tot 73 van de DEAE-cellulose-chromatografie afzonderlijk opge-
bracht (gemarkeerd door |).

De elektroforetische mobiliteiten van de grootte-markeringseiwit-
ten in M (fosforylase B, [M_r]=94.000], runderserumalbumine
[M_r =67.000], ovalbumine [M_r =43.000], carboanhydrase [M_r =30.000],
sojabonen-trypsine-inhibitor [M_r =20.000] en α -lactalbumine
[M_r =14.000] en de daarbij behorende m_r -waarden ($\times 10^3$) zijn met
pijlen gemarkeerd.

C O N C L U S I E S

1. Microbieel bereid humaan-interleukine-1, in hoofdzaak endotoxine-vrije en als een in hoofdzaak homogeen eiwit met een specifieke aktiviteit van tenminste 5×10^7 eenheden/mg.

2. Humaan-interleukine-1 volgens conclusie 1, gekenmerkt, doordat dit humaan-interleukine-1 α is.

3. Humaan-interleukine-1 volgens conclusie 1, gekenmerkt door de in fig.1 aangegeven aminozuurvolgorde.

10 4. Humaan-interleukine-1 volgens een der conclusies 1-3 als farmaceutisch middel.

5. Werkwijze voor het bereiden van humaan-interleukine-1 volgens een der conclusies 1-3, met het kenmerk, dat men cellen van microben, getransformeerd met een expressievector, welke het gen voor recombinant humaan-interleukine-1 bevat, en voor de expressie van het genoemde gen induceert, ontsluit, onoplosbaar celmateriaal van een cytosolfractie afscheidt, deze cytosolfractie onder toepassing van een gebufferde zoutoplossing aan een gelfiltratie onderwerpt, de biologisch actieve frakties van de gelfiltratie verenigt en deze aan een ionenuitwisselings-chromatografie onder toepassing van een gradiënt van een toenemende zoutconcentratie in een gebufferde oplossing onderwerpt.

6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat men de cellen van de microben door middel van een behandeling met ultrageluid ontsluit.

25 7. Werkwijze volgens conclusie 5 of 6, met het kenmerk, dat men de genoemde gelfiltratie uitvoert over een Sephacryl^(R) S-200-kolom en dat men als gebufferde zoutoplossing een met tris/HCl gebufferde NaCl-oplossing gebruikt.

8. Werkwijze volgens een der conclusies 5-7, met het kenmerk, dat men de genoemde ionenuitwisselings-chromatografie onder toepassing van een DEAE-cellulose bevattende kolom uitvoert en dat men als de genoemde gradiënt met een toenemende zoutconcentratie in een gebufferde oplossing een 0-800 mM NaCl-gradiënt in tris/HCl-buffer gebruikt.

9. Farmaceutisch preparaat, gekenmerkt door een gehalte aan humaan-interleukine-1 volgens een der conclusies 1-3 resp. bereid volgens de werkwijze van een der conclusies 5-8.

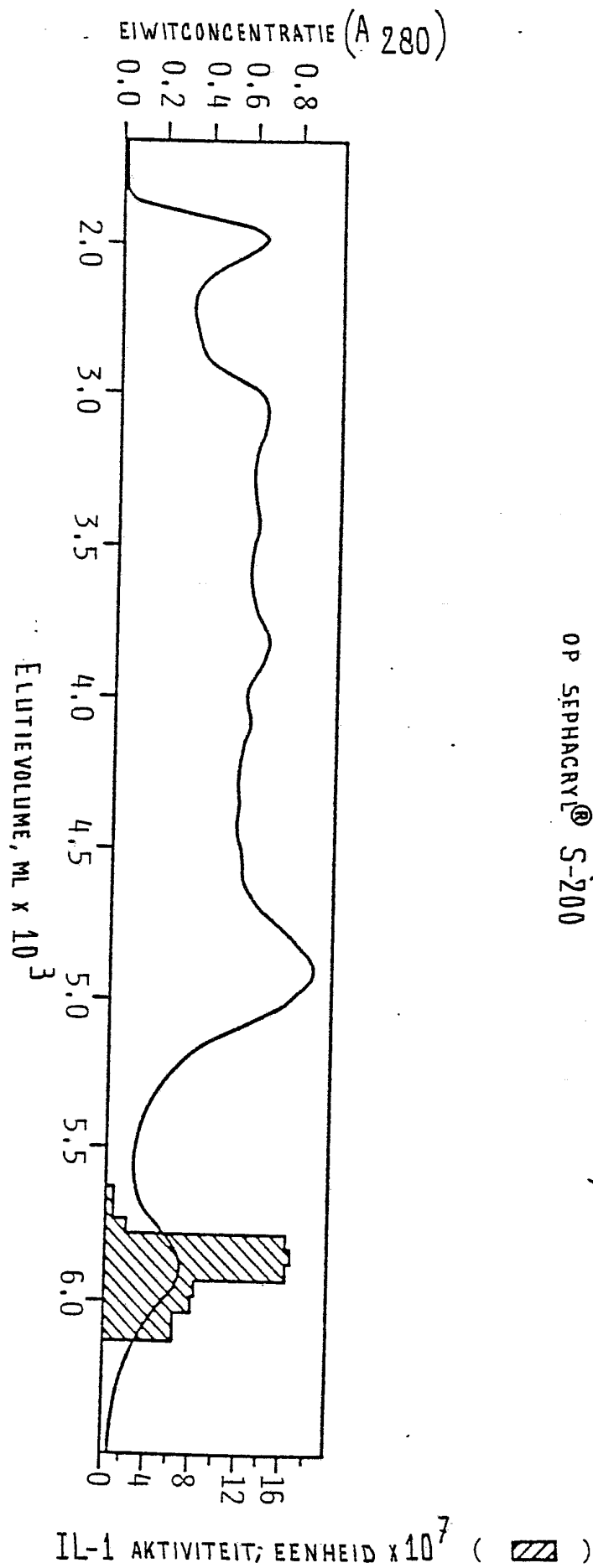
10. Toepassing van een humaan-interleukine-1 volgens een der conclusies 1-3 resp. verkregen volgens de werkwijze van een der conclusies 5-8 voor de behandeling en profylaxe van ziekten.

FIG 1

Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile
Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn
Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr
Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys
Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp
Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr
Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro
Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile Pro Lys Thr
Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp
Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val
Ala His Pro Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp
Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser Ile
Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala

FIG 2

GELFILTRATIE VAN E. COLI - CYTOSOL (OPLOSBAAR RHIL-1 α)
OP SEPHACRYL® S-200



8700397

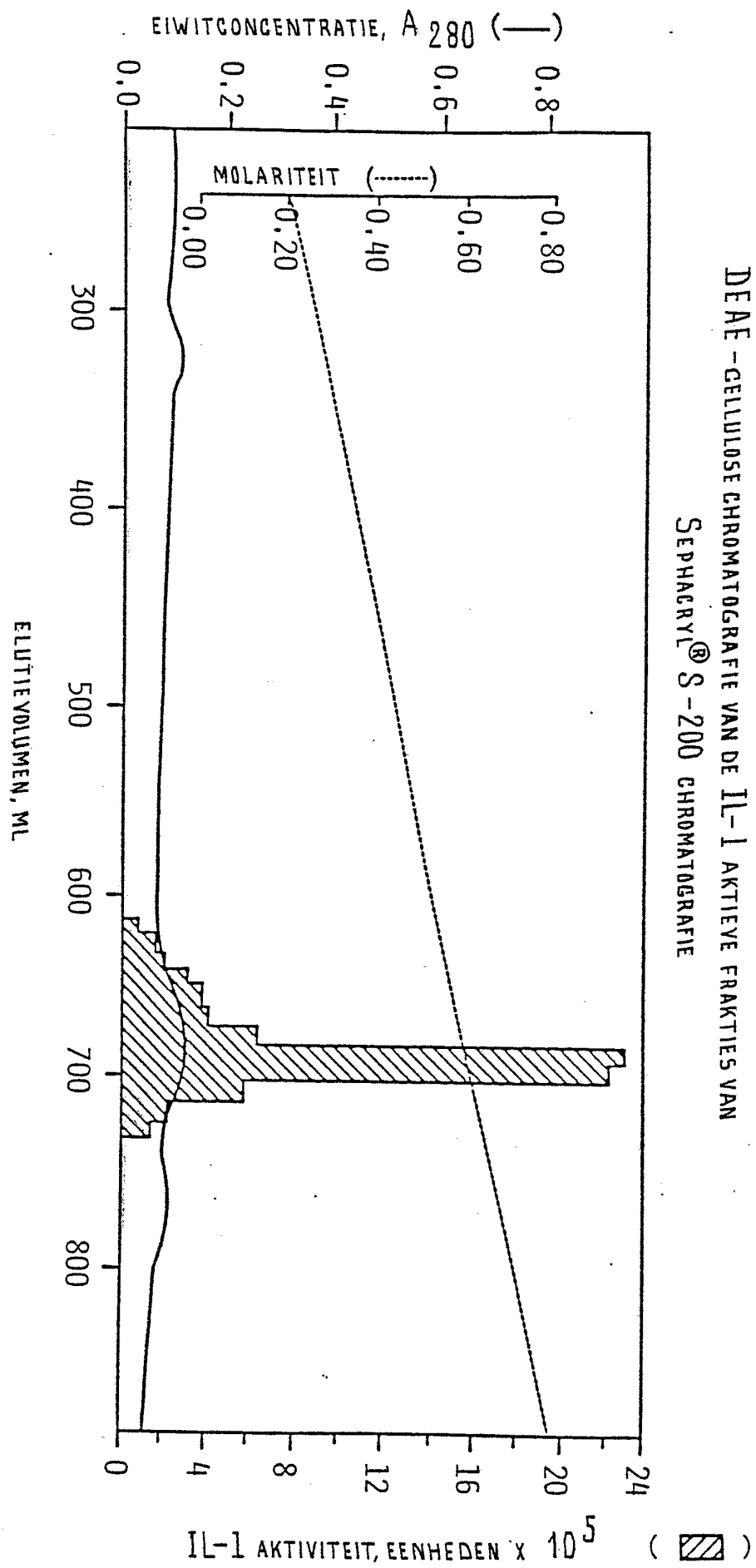
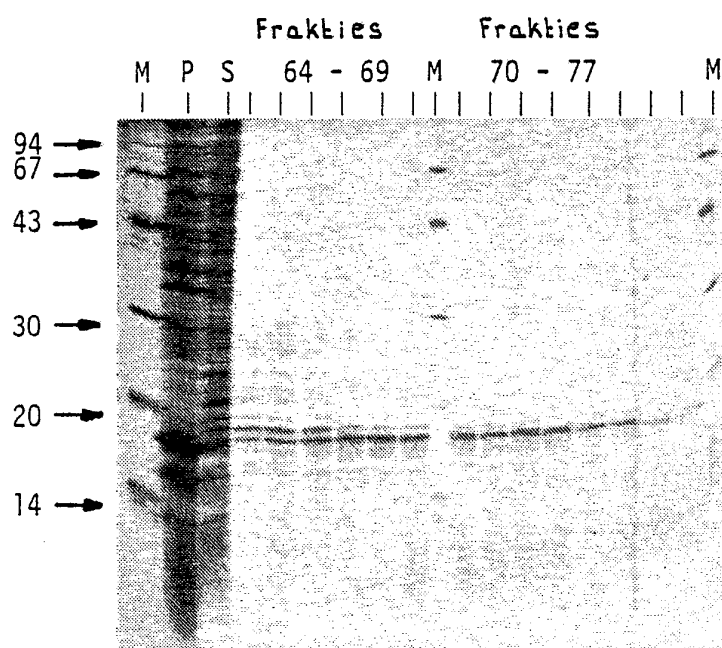


FIG 3

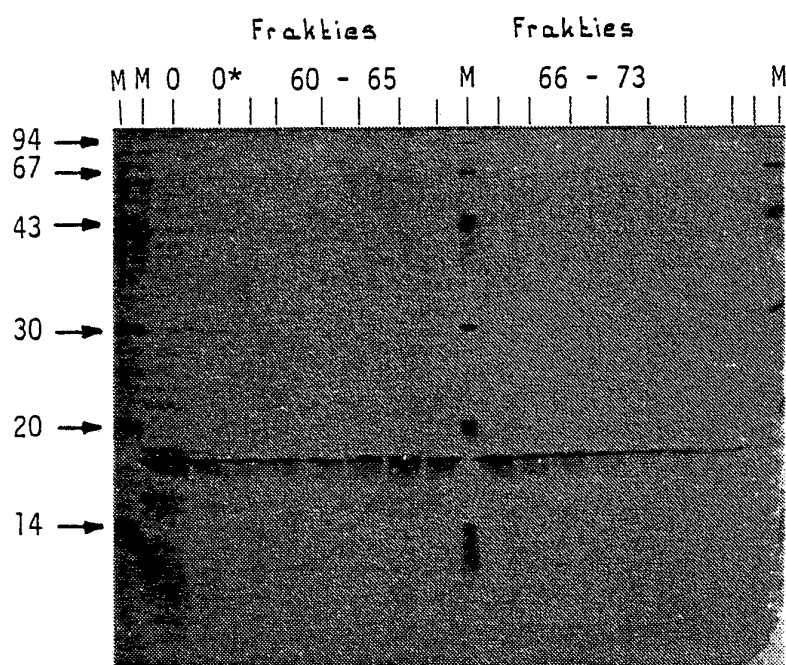
870 0397

FIG 4

A



B



870 0397