

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 471

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2001 - 1115

(22) Přihlášeno: 12.10.1990

(30) Právo přednosti:
13.10.1989 US 1989/421444

(40) Zveřejněno: 16.08.2000

(Věstník č. 8/2000)

(47) Uděleno: 14.01.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12.03.2003
(Věstník č. 3/2003)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 K 14/505

C 12 N 15/16

(73) Majitel patentu:

KIRIN-AMGEN, INC., Lucerne, CH;

(72) Původce vynálezu:

Strickland Thomas Wayne, Moorpark, CA, US;
Byrne Thomas Edward, Bethesda, MD, US;
Elliott Steven George, Thousand Oaks, CA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy směsi erythropoietinových
isoform**

(57) Anotace:

Způsob přípravy směsi erythropoietinových isoform, při němž se a) vybere dvě nebo více erythropoietinových isoform, z nichž každá vykazuje jediný isoelektrický bod a má specifický počet sialových kyselin na isoformu erythropoietinu, kde uvedený počet je vybrán ze skupiny, zahrnující 1 až 14; a b) tyto isoformy se smísí tak, aby výsledná směs vykazovala předem určený počet sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

CZ 291471 B6

Způsob přípravy směsi erythropoietinových isoformem

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu přípravy směsi erythropoietinových isoformem.

Dosavadní stav techniky

10

Erythropoietin je glykoproteinový hormon zjištěný při zrání erythroidních progenitorových buněk na erythrocyty. Má podstatný význam při regulaci hladin červených krvinek v oběhu. Přirozeně se vyskytující erythropoietin je produkován játry během fetálního života a ledvinami u dospělých a cirkuluje v krvi a stimuluje produkci červených krvinek v kostní dřeni. Anemie je téměř vždy důsledkem renálního poškození, působícího snížení produkce erythropoietinu v ledvinách. O rekombinantním erythropoietinu, produkovaném technikami genového inženýrství, zahrnujícími expresi proteinového produktu hostitelskými buňkami transformovanými genem kodujícím erythropoietin bylo zjištěno, že je účinný, jestliže se použije při léčení anemie vzniklé z chronického renálního poškození.

20

Dosud byla dostupnost erythropoietinu velmi omezena. I když je protein přítomen v lidské moči, vylučovaná množství jsou příliš nízká pro praktický zdroj erythropoietinu pro terapeutické využití. Pacienti postižení aplastickou anémií vykazují zvýšení hladiny urinárního erythropoietinu ve srovnání se zdravými individui, ale omezené množství takové moče rovněž činí tento zdroj nepraktickým. Purifikace lidského urinárního erythropoietinu podle Miyakeho a spol., J. Biol. Chem., 252, 5558 (1977), používá jako výchozí materiál moč od osob s aplastickou anémií.

25

Identifikace, klonování a exprese genů, kodujících erythropoietin je popsán v patentu US 4 703 008. Linnem. Popis purifikace rekombinantního erythropoietinu z buněčného média, podporujícího růst savčích buněk, obsahujících rekombinantní erythropoietinové plasmidy je např. zahrnuta v patentu US 4 667 016 Laie a spol. Expres a získání biologicky aktivního rekombinantního erythropoietinu ze savčích hostitelských buněk, obsahujících erythropoietinový gen v rekombinantním plasmidu, poskytuje v první řadě dostatečné množství erythropoietinu vhodného pro terapeutické aplikace. Dále znalost genové sekvence a dostupnost větších množství purifikovaného proteinu umožňuje lepší pochopení působení tohoto proteinu.

35

Biologická aktivita proteinu je závislá na jeho struktuře. Zejména primární struktura proteinu (tj. jeho aminokyselinová sekvence) poskytuje informaci, která umožňuje formaci sekundární (např. α -helx nebo β -list) a terciární (trojrozměrné přehyby) struktury polypeptidu během a po jeho syntéze. Prerušování vlastních sekundárních a terciárních struktur zavedením mutací nebo chemickým nebo enzymatickým zpracováním, může vést ke snížení biologické aktivity.

40

V prokaryotních organismech jsou biologické aktivity proteinů z velké části ovládány výše uvedenými strukturami. Na rozdíl od proteinů z prokaryotních buněk je mnoho buněčných povrchů a sekretovaných proteinů v eukaryotních buňkách modifikováno jednou nebo více oligosacharidovými skupinami. Tato modifikace označovaná jako glykosylace může výrazně ovlivnit fyzikální vlastnosti proteinů a může také být důležitá pro stabilitu proteinu, sekreci a subcelulární lokalizaci. Vlastní glykosylace může mít základní význam pro biologickou aktivitu. Některé geny z eukaryotních organismů, když jsou exprimovány v bakteriích (např. E. coli), které postrádají celulární procesy pro glykosylaci proteinů, poskytují proteiny, které mají malou nebo žádnou aktivitu díky nedostatku glykosylace.

50

Glykosylace se uskutečňuje při specifických místech podél polypeptidového hlavního řetězce a je obvykle dvou typů: O-vázané oligosacharidy jsou spojené se serinovými nebo threoninovými zbytky, zatímco N-vázané oligosacharidy jsou připojeny k asparaginovým zbytkům, jestliže jsou

55

tyto části sekvence Asn-X-Ser/Thr, kde X může být jakákoliv aminokyselina s výjimkou prolinu. Struktury N-vázaných a O-vázaných oligosacharidů a cukerných zbytků nalezené v každém typu, jsou rozdílné. Jeden typ cukru je obvykle nalezen na obou, je jím N-acetylneuraminová kyselina (dále nazývaná jako sialová kyselina). Sialová kyselina je obvykle terminální zbytek obou N-vázaných a O-vázaných oligosacharidů a díky svému negativnímu náboji uděluje glykoproteiny kyselý charakter.

Jak lidský z moče získaný erythropoietin, i rekombinantní erythropoietin (exprimovaný v savčích buňkách), mající aminokyselinovou sekvenci 1 – 165 lidského erythropoietinu, obsahují tři N-vázané a jeden O-vázaný oligosacharidový řetězec, kde tyto řetězce tvoří asi 40 % celkové molekulové hmotnosti glykoproteinu. N-vázaná glykosylace probíhá na asparaginových zbytcích, umístěných v polohách 24, 38 a 83, zatímco O-vázané glykosyly probíhá na serinovém zbytku umístěném v poloze 126 (Lai a spol., J. Biol. Chem. 261, 3116 (1986); Broudy a spol. Arch. Bioche. Biophys. 265, 329 (1988)). Oligosacharidové řetězce mohou být modifikovány terminálními zbytky sialové kyseliny. Enzymatické zpracování glykosylovaného erythropoietinu pro odstranění zbytků sialové kyseliny vede ke ztrátě in vivo aktivity, ale nepůsobí ztrátu aktivity in vitro (Lowy a spol., Nature 185, 102 (1960); Goldwasser a spol., J. Biol. Chem. 249, 4202 (1974)). Toto chování může být využito při rychlém odstranění asialoerythropoietinu z oběhu po interakci s hepatickým proteinem, který váže asialoglykoprotein (Morrell a spol. J. Biol. Chem. 243, 155 (1968); Briggs a spol. Am. J. Physiol. 227, 1385 (1974); Ashwell a spol., Methods Enzymol. 50, 287 (1978)). Erythropoietin tak vykazuje in vivo biologickou účinnost pouze, když je sialylován, a je tak zabráněno jeho vazbě hepatickým vazacím proteinem.

Úloha jiných složek v oligosacharidových řetězcích není definována dostatečně. Bylo zjištěno, že neglykosylovaný erythropoietin má velmi sníženou in vivo aktivitu ve srovnání s glykosylovanou formou, ale udržuje si aktivitu in vitro (Dordal a spol. Endocrinology 116, 2293 (1985); Linův patent výše). V další studii nicméně odstranění N-vázaných nebo O-vázaných oligosacharidových řetězců jednotlivě nebo společně mutagenesí asparaginových nebo serinových zbytků, které jsou glykosylačními místy, výrazně snižuje in vitro aktivitu přeměněného erythropoietinu, který je produkován v savčích buňkách (Dube a spol. J. Biol. Chem. 263, 17516 (1988)).

Glykoproteiny jako je erythropoietin mohou být separovány na různě nabitě formy za použití technik jako je isoelektrická fokusace (IEF). Jsou uváděny IEF studie surového a částečně purifikovaných erythropoietinových přípravků (Lukowsky a spol., J. Biochem 50, 909 (1972); Shelton a spol. Biochem. Med. 12, 45 (1975); Fuhr a spol. Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 930 (1981)). Nanejvýš tři nebo čtyři frakce mající erythropoietinovou aktivitu byly rozlišeny IEF v těchto studiích a žádná nebyla charakterizována s ohledem na obsah cukrů. Dále nebyl stanoven žádný vztah mezi isoelektrickými body frakcí a jejich biologickou aktivitou.

V průběhu purifikace urinárního erythropoietinu z lidské moče, popisované v práci Miyakeho a spol., supra, byly zjištěny dvě erythropoietinové frakce z chromatografie na hydroxylapatitu označené jako II a IIIA, mající stejnou specifickou aktivitu. Následující analýza cukrů frakce II a IIIA prokázala, že frakce II má větší průměrný obsah sialové kyseliny než frakce IIIA (Dordal a spol. supra).

Podstatou předloženého vynálezu je poskytuje separované a izolované isoformy erythropoietinu, mající definovaný obsah sialových kyselin a biologickou aktivitu. Farmaceutické přípravky, obsahující takové molekuly by mohly být terapeuticky prospěšné.

50

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob přípravy směsi erythropoietinových isoform, jehož podstata spočívá v tom, že se

55

- a) vybere dvě nebo více erythropoietinových isoform, z nichž každá vykazuje jediný isoelektrický bod a má specifický počet sialových kyselin na isoformu erythropoietinu, kde uvedený počet je vybrán ze skupiny, zahrnující 1 až 14; a
- 5 b) tyto isoformy se smísí ta, aby výsledná směs vykazovala předem určený počet sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

Přehled obrázků na výkresech

10

Obr. 1 představuje analytický isoelektrickofokusační gel z dělení rekombinantních erythropoietinových isoform. Gelové dráhy 1–11 představují isoformy v rozmezí od méně kyselých (vyšší pI) ve dráze 1 ke kyseljším (nižší pI) ve dráze 11. Čištěný rekombinantní erythropoietin obsahující směs isoformem 9–14 je také uveden v poslední levé a pravé dráze gelu.

15

20

Obr. 2 představuje vztah mezi počtem sialových kyselin na erythropoietinovou isoformu a specifickou aktivitu in vivo každé isoformy, vyjádřenou jako jednotku na mg erythropoietinového polypeptidu. Na obr. 2A, byla koncentrace každé erythropoietinové isoformy stanovena Bradfordovou proteinovou zkouškou, na obr. 2B, byla koncentrace stanovena absorbcí při 280 nm, na obr. 2C, byla koncentrace stanovena pomocí RIA.

25

30

Obr. 3 představuje analytický isoelektrofokusační gel definovaných směsí rekombinantních erythropoietinových isoform připravených aniontovýměnnou chromatografií za různých podmínek. Gelové dráhy 1–6 představují erythropoietinové isoformy eluované při vysokosolném promývání po promývání Q-Sepharosové kolony 150 mM kyselinou octovou, pH 4,7, 150 mM kyselinou octovou (nepufrovaná), 200 mM kyselinou octovou, pH 4,7, 250 mM kyselinou octovou, pH 4,7, 300 mM kyselinou octovou, pH 4,7 nebo 300 mM kyselinou octovou (nepufrovanou). Čištěný rekombinantní erythropoietin, obsahující směs isoformem získaný za použití postupů popsanych v příkladu 2 práce Laie a spol. supra, s tím rozdílem, že DEAE-agarozová chromatografie je nahrazena chromatografií na Q-Sepharose, je znázorněn ve dráze zcela vlevo na gelu.

35

40

Obr. 4 představuje separaci erythropoietinových isoformem 8 až 12 získaných zpracováním média buněk na sloupci Q-Sepharozy gradientem klesajícího pH a zvyšující se iontové síly. Podíly z frakcí označených 2 až 40 byly podrobeny analytické isoelektrické fokusaci. Čištěný rekombinantní erythropoietin obsahující směs isoformem, získaných za použití postupů popsanych v příkladu 2 práce Laie a spol. supra, s tím rozdílem, že DEAE-agarosová chromatografie byla nahrazena chromatografií na Q-Sepharose, je uveden v poslední levé dráze tohoto gelu.

45

Obr. 5 představuje aminokyselinovou sekvenci lidského erythropoietinu. Čtvrtky označují asparaginové zbytky, ke kterým jsou připraveny karbohydrátové řetězce a hvězdičky označují threoninové a serinové zbytky modifikované karbohydrátem. Další glykosylační místa poskytnutá v analozích z příkladu 6 jsou indikována mutacemi asparaginu, serinu a threoninu.

50

Obr. 6A, 6B a 6C představují série stupňů klonování při generování plasmidů pro konstrukci a analýzy analogů lidského erythropoietinu. Tyto analogy mají aminokyseliny změněné jak je uvedeno na obr. 5, které poskytují další glykosylační místa.

55

Obr. 7 představuje analýzy Western blot COS buněčných supernatantů sekvencí lidského erythropoietinu a indikovaných erythropoietinových analogů. Analogy /Asn⁹, Ser¹¹ /EPO, /Asn⁶⁹ /EPO, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷ /EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵ /EPO jsou konstruovány jak je popsáno v příkladu 6. Analogy /Pro¹²⁵, Thr¹²⁷ /EPO, /Asn¹²⁶, Ser¹²⁸ /EPO a /Thr¹²⁵,

Ser¹²⁷/EPO, které neobsahují další karbohydrátové řetězce jsou zde uvedeny pro srovnání.

- 5 Obr. 8 představuje Western blot analýzu COS buněčných supernatantů sekvencí lidského erythropoietinu a indikovaných erythropoietinových analogů po zpracování s N-glykanasou. Analogy /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO jsou konstruovány jak je popsáno v příkladu 6. Analogy /Val¹²⁶/EPO, /Pro¹²⁴/EPO, /Pro¹²⁵/EPO, /Thr¹²⁷/EPO, /Pro¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO a /Thr¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO jsou uvedeny pro srovnání.
- 10 Obr. 9 představuje isoelektrofokusační gel poolů 2, 3 a 4 získaných chromatografií na Q-Sepharose a C4 reverzní fází zpracováním buněčného média, které podporuje růst CHO buněk transfektovaných erythropoietinovou cDNA, obsahující /Thr¹²⁵/mutaci. Čištěný rekombinantní erythropoietin, obsahující směs isoform je získán za použití postupů, popsaných v příkladu 2 práce Laie a spol., supra, s tím rozdílem že
- 15 DEAE-agarosová chromatografie je nahrazena chromatografií na Q-sepharose, tyto erythropoietiny jsou uvedeny v levých a pravých drahách gelu.

Podle předloženého vynálezu jsou poskytovány isoformy erythropoietinu. Isoelektrická fokusace (IEF) dělení proteiny na základě náboje. Při umístění do gradientu pH a působením elektrického pole budou proteiny migrovat k bodu, ve kterém nemají náboj sítě a zůstávají na tomto místě. Toto je isoelektrický bod (pI) proteinu. Každý jednotlivý pruh pozorovaný při IEF představuje molekuly mající určitý pI a tím tedy obecně i stejný náboj a jsou nazvány jako isoformy. Použitý výraz „erythropoietinová isoforma“ označuje erythropoietinové přípravky, mající jediné pI a mající stejné aminokyselinové sekvence.

25 Ve výhodném provedení je erythropoietin produkt exprese exogenní DNA sekvence, která byla transfektována do jiných eukaryotních hostitelských buněk než lidských, tj., ve výhodném provedení je erythropoietin „rekombinantní erythropoietin“. Rekombinantní erythropoietin je výhodně produkován postupem popsaným Linem, patent US 4 703 008, uvedeným zde pro úplnost. Rekombinantní erythropoietin je výhodně čištěn podle obecných postupů popsaných v příkladu 2 a patentu US 4 667 016 Laie a spol., který je zde uveden jako odkaz nebo alternativně postupem popsaným v příkladu 2, kde chromatografie na DEAE agarose je nahrazena chromatografií na Q-Sepharose. V modifikaci se sloupcem Q-Sepharosa se 55 mM NaCl nahradí 25 mM NaCl v pufrovaném roztoku pro uvedení kolony na neutrální pH a 140 mM

30 NaCl se nahradí 75 mM NaCl v pufrovaném roztoku pro eluci erythropoietinu z kolony. Tento materiál při analýze elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným, migruje jako jediný druh (tj. pruh). Jestliže se čištěný erythropoietin podrobí IEF, jsou v gelu zřejmé násobné pruhy, které indikují, že jsou přítomny různě nabitě formy glykoproteinu.

40 Bylo nalezeno, že jednotlivé isoformy rekombinantního erythropoietinu, mající aminokyselinovou sekvenci z moče získaného lidského erythropoietinu odpovídající erythropoietinovým molekulám, majícím od 1 do 14 sialových kyselin a každá isoforma přítomná v čištěném rekombinantním erythropoietinu má in vivo aktivitu která má vztah k počtu sialových kyselin isoformy. Výraz „erythropoietin“, jak je zde použit, zahrnuje přirozeně získaný erythropoietin, z moče získaný lidský erythropoietin jakož i nepřirozeně se vyskytující polypeptidy, mající aminokyselinovou sekvenci a glykosylaci dostatečně duplikativní s přirozeně se vyskytujícím erythropoietinem pro získání in vivo biologických vlastností takových, že buňky kostní dřeně zvyšují produkci retikulocytů a červených krvinek.

50 Surové přípravky erythropoietinu mají mnoho isoform, ale materiál čištění například Laien a spol. supra příklad 2, obsahuje převážně šest isoform při analýze IEF. Dále byla detekována nejméně jedna další isoforma vyšší kyselosti při použití chromatografických postupů popsaných v příkladu 4. (Tato více kyselá forma, migrující při >14 sialových kyselinách na IEF gelu může obsahovat negativní náboje nesialové kyseliny jak je zřejmé z odolnosti vůči štěpení sialidasou). Tyto isoformy se od sebe liší obsahem sialové kyseliny. Jak je uvedeno v příkladech, je toto

55

doloženo izolací 10 takových isoformem při preparativní IEF a stanovením obsahu sialové kyseliny u pěti z nich. Z isoformem zkoušených na obsah sialové kyseliny bylo zjištěno, že pět isoformem obsahuje buď 9, 10, 11, 12, nebo 13 zbytků sialové kyseliny.

5 Existuje vztah mezi relativní in vivo specifickou aktivitou erythropoietinu a počtem zbytků sialové kyseliny na molekulu erythropoietinu od isoformy 5 od 11 (každá isoforma je zde označena počtem sialových kyselin na molekulu erythropoietinu). Isoformy 11 až 14 mají
 10 přibližně stejnou in vivo specifickou aktivitu. Isoformy 5 – 14 byly studovány pokud jde o jejich in vivo aktivitu exhypoxickou polycythemickou biozkouškou na myších a množství každé přítomné isoformy je stanoveno Bradfordovou proteinovou zkouškou, absorbance při 280 nm nebo radioimuno zkouškou (RIA) erythropoietinu. RIA stanovení (Egrie a spol. Immunobiology 172, 213 (1986)) vyjádřené jako jednotky/ml jsou rozděleny mezi 212, 770 jednotkami/mg erythropoietinového polypeptidu, průměrná specifická aktivita čištěného erythropoietinu stanovené pomocí RIA udávají proteinové koncentrace izolovaných isoformem nebo směsi isoformem,
 15 vyjádřené jako mg erythropoietinového polypeptidu/ml. Jak je uvedeno v příkladech, relativní in vivo aktivita se postupně zvyšuje od isoformy 5 do isoformy 11 (viz tabulka 2).

In vivo specifické aktivity, které jsou zde uváděny, jsou měřeny relativních in vivo specifických aktivit a nejedná se o absolutní in vivo specifické aktivity. Pro účely této přihlášky jsou
 20 specifické aktivity použity pouze pro srovnání relativních aktivit isoformem, studiím za stejných podmínek ve stejných pokusech, zahrnujících stejné vnitřní standardy, stejný typ zvířat, mající stejné analytické údaje použité pro výpočet specifické aktivity, stejnou zkoušku pro stanovení obsahu proteinu. Není předpokládáno, že jakákoliv hodnota in vivo specifické aktivity uvedená pro jakoukoliv isoformu představuje základní nebo absolutní hodnotu pro tuto isoformu.

25 Předložený vynález poskytuje erythropoietinové isoformy. Specifické isoformy erythropoietinu, získané v souladu s předloženým vynálezem a jejich vlastnosti se mohou měnit v závislosti na zdroji výchozího materiálu. Například isoformy z moče získaného lidského erythropoietinu jsou odlišné od isoformy rekombinantního erythropoietinu. Ve výhodném provedení se vynález týká
 30 erythropoietinové isoformy mající specifický počet (např. pevný počet vyšší než 0) sialových kyselin na molekulu erythropoietinu, uvedený počet je zvolen ze skupiny zahrnující 1 až 14. Výhodný je počet 9, 10, 11, 12, 13 nebo 14. V dalším provedení je počet vyšší než 14, výhodně 16 až 23.

35 Tento vynález také poskytuje přípravky, obsahující dvě nebo více erythropoietinových isoformem. V jednom provedení kompozice zahrnují směs isoformem, majících více než předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu erythropoietinu, např. vyšší než 11 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu nebo vyšší než 12 sialových kyselin na molekulu, např. směs isoformem 12, 13 a 14. V dalším provedení kompozice obsahují směsi isoformem, mající předeterminovaný
 40 počet sialových kyselin na erythropoietinovou molekulu, např. více než 12, ale více než 8 sialových kyselin na molekulu jako je např. směs isoformem 9, 10 a 11. Vynález také poskytuje přípravky obsahující erythropoietinové isoformy, kde jsou relativní množství isoformem stejná nebo rozdílná. Například směsi isoformem 9, 10 a 11 by mohly mít isoformy v různých poměrech jako je 1:1:1, 2:3:1 nebo 20:20:1.

45 Výhodně přípravky obsahují směsi méně než čtyř isoformem, například směs isoformem 11, 12 a 13, nebo směs 12 a 14, nebo směs 7 a 13.

50 Pro přípravu směsí erythropoietinových isoformem vynález také poskytuje způsoby současné izolace vybraných erythropoietinových isoformem. Tyto postupy zahrnují izolaci individuálních isoformem takovými technikami jako je isoelektrická fokusace nebo příprava směsí isoformem, majících předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu (například vyšší než 11) takovými technikami jako je iontovýměnná chromatografie nebo chromatofokusace. Všechny tyto techniky jsou založeny na separaci proteinů podle náboje.

55

Obecně, iontovýměnná chromatografie a chromatofokusace zahrnují aplikaci buď surového lidského erythropoietinu (buněčné kondicionované médium), nebo čištěného materiálu na sloupec pryskyřice za podmínek, kdy dochází k vázání některých nebo všech erythropoietinových isoform na pryskyřici. U surových erythropoietinových přípravků je výhodné aplikovat protein na sloupec při asi pH 7, zatímco pro čištěné přípravky může být protein aplikován na kolonu při pH 7 až asi pH 7. Po promytí sloupce pufrům při asi pH 4 se tyto erythropoietinové isoformy, které zůstaly vázány na sloupci ionexu, eluují při zvyšujícím se pH a koncentraci soli pufru nebo aplikací gradientu snižujícího se pH a zvyšující se iontové síly při pH asi 4. Při chromatofokusaci jsou isoformy eluovány ze sloupce gradientem snižujícího se pH nebo promýváním sloupce vysokou koncentrací soli.

Jedno provedení vynálezu se týká savčích (např. z ovaria čínského křečka, CHO) hostitelských buněk, které přednostně syntetizují erythropoietinové isoformy, mající více než specifický počet, např. více než 10 sialových kyselin na molekulu. Erythropoietinové molekuly mají N-vázané nebo O-vázané oligosacharidové struktury, které mohou limitovat obsah sialové kyseliny v molekule. Například, tetraantennární (čtyř-rozvětvené) N-vázané oligosacharidy neobvykleji poskytují čtyři možná místa pro připojení sialové kyseliny, zatímco bi- a triantennární oligosacharidové řetězce, které mohou nahradit tetraantennární formu na asparaginových připojovacích místech, mohou obvykle připojovat nejvýše dvě nebo tři sialové kyseliny. O-vázané oligosacharidy obvykle poskytují dvě místa pro připojení sialové kyseliny. Erythropoietinové molekuly tak mohou akomodovat celkem 14 zbytků sialové kyseliny s tím, že všechny tři N-vázané oligosacharidy jsou tetraantennární. Kultury savčích buněk jsou prohledávány na tyto buňky, které mají přednostně připojeny tetraantennární řetězce k rekombinantnímu erythropoietinu, a tedy maximalizovaný počet míst pro připojení sialové kyseliny.

Navázané oligosacharidy erythropoietinu z moče obsahují sialovou kyselinu na obou spojeních α 2,3 a α 2,6 ke galaktóze (Takeuchi a spol., J. Biol. Chem. 263, 3657 (1988)). Typicky je sialová kyselina v α 2,3 spojení připojena ke galaktóze α 1,6 rozvětvením mannózy a sialová kyselina v α 2,6 spojení je připojena ke galaktóze α 1,3 rozvětvením mannózy. Enzymy, které připojují tyto sialové kyseliny (β -galaktosid α 2,3 sialyltransferáza a β -galaktosid α 2,6 sialyltransferáza) jsou nejučinnější při připojování sialové kyseliny k mannóze α 1,6 a mannóze α 1,3 větvení.

Dihydrofolát reduktázu (DHFR) postrádající buňky ovaria čínského křečka (CHO) se obvykle používají jako hostitelské buňky pro produkci rekombinantních glykoproteinů včetně rekombinantního erythropoietinu. Tyto buňky neexprimují enzym β -galaktosid α 2,6-sialyltransferázu, a proto nepřidávají sialovou kyselinu k α 2,6 spojení N-vázaného oligosacharidu glykoproteinů produkovaných v těchto buňkách. (Mutasaers a spol. Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986); Takeuchi a spol. J. Chromatogr. 400, 207 (1987)). Následkem toho rekombinantní erythropoietin produkovaný CHO buňkami postrádá sialovou kyselinu na spojeních 2,6 ke galaktóze (Sasaki a spol., (1987), supra; Takeuchi a spol., (1987), supra). V dalším provedení vynálezu je erythropoietin použit pro produkci isoformem připravován v CHO buňkách, které jsou transfektovány funkčním β -galaktosid α 2,6-sialyltransferázovým genem pro získání inkorporace sialové kyseliny do α 2,6 vazby ke galaktóze. Viz Lee a spol. J. Biol. Chem. 264, 13848 (1989), práce je zde uvedena jako odkaz pro popis technik pro získání modifikovaných CHO buněk nebo jiných savčích hostitelských buněk.

Do vynálezu jsou rovněž zahrnuty některé analogy lidského erythropoietinu. Použitý výraz „analog lidského erythropoietinu“ představuje erythropoietin s jedním nebo více náboji v aminokyselinové sekvenci lidského erythropoietinu, což vede k zvýšení počtu míst pro připojení sialové kyseliny. Analogy jsou poskytovány místně řízenou mutagenezí, zahrnující adice, delece nebo substituce aminokyselinových zbytků, což přeměňuje místa tak, že jsou dostupná pro glykosylaci. Takové analogy mají větší počet karbohydrátových řetězců než lidský erythropoietin.

Jejich analogy mající zvýšenou biologickou aktivitu jsou konstruovány zvyšováním obsahu sialové kyseliny v molekule erythropoietinu. Analogy mající obsah sialové kyseliny vyšší než bylo nalezeno u lidského erythropoietinu jsou připravovány přidáváním glykosylačních míst, která nebudou poškozovat sekundární nebo terciární konformaci potřebnou pro biologickou aktivitu. Výhodně analog lidského erythropoietinu má 1,2 nebo 3 přídavná místa pro N-glykosylaci nebo O-glykosylaci. Například leucin v poloze 69 je nahrazen asparaginem za vzniku sekvence Asn-Leu-ser, která slouží jako čtvrté místo pro N-glykosylaci. Taková změna může obvykle poskytnout až čtyři další sialové kyseliny na molekulu. Příklady dalších změn, které generují další N- nebo O-glykosylační místa jsou alaniny v polohách 125 až 127 na asparagin a serin, alanin v poloze 125 na threonin a alaniny v polohách 124 a 125 na prolin a threonin. Pro odborníky bude zřejmé, že předložený vynález zahrnuje mnohé další analogy lidského erythropoietinu, mající další místa pro glykosylaci.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají farmaceutické přípravky obsahující terapeuticky účinné množství specifické isoformy nebo směs isoform společně se vhodným ředidlem, přísadou a/nebo nosičem vhodným při erythropoietinové terapii. Výraz „terapeuticky účinné množství“, které je zde použito, zahrnuje množství, které vyvolává terapeutické účinek při daných podmínkách a režimu podání. Podání erythropoietinových isoform se výhodně provádí parenterálním způsobem. Specifický způsob bude záviset na podmínkách, které jsou ošetřovány. Podání erythropoietinových isoform je výhodně provedeno v části přípravku, který obsahuje vhodný nosič jako je lidský serový albumin, vhodné ředidlo jako je puřovaný salinický roztok a/nebo vhodná přísada. Potřebná dávka bude taková, že její množství dostačuje ke zvýšení hematokritu pacienta a bude záviset na obtížnosti podmínek, které mají být ošetřovány, způsobu podání a podobně.

Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu, ale nikterak jej neomezují. Erythropoietinový standard použitý v in vivo biostudiích v příkladech je rekombinantní erythropoietinový standard, který byl standardizován vůči částečně čištěnému erythropoietinovému standardu z moče. Takto jsou měřeny pouze relativní in vivo specifické aktivity. In vivo specifické aktivity jsou vyjádřeny v „jednotkách/ml“, „jednotkách/mg“ a „jednotkách/A280“ a ne jako „IU/ml“, „IU/mg“ a „IU/A280“, protože použitý erythropoietinový standard není přímo korelován k mezinárodnímu existujícímu standardu.

Příklady provedení

Příklad 1

Izolace isoform rekombinantního erythropoietinu

Rekombinantní erythropoietin je produkován jak je popsáno Linem, supra. Rekombinantní erythropoietin použitý jako výchozí materiál pro izolaci první a třetí isoformy je čištěn podle postupu popsaného v příkladu 2 práce Laie a spol., supra. Výchozí materiál pro izolaci druhé a páté isoformy je čištěn podle Laie a spol., supra za použití modifikace Q-Sepharosové chromatografie. Tyto přípravky obsahují směs isoform rekombinantního erythropoietinu majících stejné aminokyselinové sekvence jako lidský erythropoietin získaný z lidské moče a obsahují převážně isoformy 9 až 14. Výchozí materiál pro přípravu čtvrté isoformy je materiál, který je eluován během 5 mM kyselina octová/1 mM glycin/6M močovinného promývání aniontovýmenné kolony v příkladu 2 práce Laie a spol. před použitím v preparativním isoelektrickém fokusačním postupu. Příprava šesté isoformy používá jako výchozí materiál čištěný přípravek rekombinantního erythropoietinu mající od 4 do 13 sialových zbytků. Tento materiál byl čištěn jak je popsáno v příkladu 2 Laie a spol. s výjimkou pro modifikaci iontovýmenné kolony (eluze rekombinantního erythropoietinu gradientem chloridu sodného při

pH 8,4 a vypuštění promývání kyselinou octovou /močovinou), která vede k retenci nejvíce isoformem, přítomných ve výchozím materiálu.

5 Šest různých přípravků individuálních isoformem bylo zpracováno preparativní isoelektrickou fokusací na granulovaném gelu (Ultradex, LKB) v podstatě jako LKB Application Note 198. Pharmalyte (Pharmacia) 2,5–5 amfolyty (Pharmacia) jsou používány a gelové lože obsahují 5 M močoviny.

10 V první přípravě se na gel aplikuje přibližně 20 mg rekombinantního erythropoietinu v 6,8 ml 20 mM citrátu sodného/100 mM chloridu sodného, pH 7,0 a zpracovává fokusací při 8 W po přibližně 16 hodin. Po isoelektrické fokusaci se proužky isoformem v gelu vizualizují přitisknutím papíru ke gelovému loži. Vyrobí se otisk a pak se fixuje namočením ve třech provedeních (přibližně 10 minut, teplota místnosti) do fixačního roztoku (40% methanol/10% kyselina octová/10% TCA/3,5% sulfosalicylová kyselina), podrobí další změně (asi 10 minut) – 40% methanol/10% kyselina octová (30 až 60 °C), barví se 15 minut při 60 °C v 0,125% Coomassie Blue R-250/40% methanol/10% kyselina octová a pak se odbarví v 7,5% methanolu/10% kyselině octové pro vizualizaci oddělených isoformem. Oblast granulovaného gelového lože, obsahující isoformy (~ 50 % pryskyřice) se odebere, přidá se voda (v16 ml) a kaše se nalije na misku 14 x 62 cm a odpaří se asi 40 g čisté hmotnosti. Tento přípravek se zpracuje fokusací podruhé a otisk gelového lože se připraví jak bylo výše uvedeno. Část gelu, obsahující každou ze 20 šesti rozlišitelných isoformem se odebere z gelového lože.

25 Za účelem eluce isoformem z gelu, se přidá ke každé isoformě roztok, obsahující 10 mM Tris-HCl, pH 7,0/5 mM Chaps pro přípravu kaše. Kaše umístí do malých kolon a promytí Tris-Chaps pufrem. Výtok kolonou byl odebrán a aplikován odděleně na malé kolony (otevřené uspořádání kolony), obsahující Vydac C4 pryskyřici s reverzní fází ekvilibrovanou ve 20% ethylonu/10 mM Tris-HCl, pH 7,0, 35% ethanolem/10 mM Tris-HCl, pH 7,0 a 65% ethanolem/10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Frakce eluované 65% ethanolem/10 mM Tris se zředí 1:1 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 a zahustí a pak se pufr nahradí 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 za použití 30 Centricon-10 (Amicon) mikrokonzentrátoru. Analytická isoelektrická fokusace tohoto přípravku se provede v podstatě jak je popsáno v LKB technická poznámka 250 za použití Servalyte 3–5 ampholinů (Serva) v polyakrylamidovém gelu, obsahujícím 5 M močoviny.

35 Ve druhé přípravě se na gel aplikuje asi 26 mg rekombinantního erythropoietinu v 6,5 ml deionizované vody a fokusuje se při 2,5 W po 35 minut s 10 W asi 17 hodin. Proužky fokusovaného proteinu, které jsou viditelné v gelovém loži se odeberou jako 11 různých skupin. Každá skupina se převede do asi 7,5 ml deionizované vody a 20 ml každé z výsledných supernatantů z těchto skupin se podrobí analytické isoelektrické fokusaci, jak je popsáno výše. Ke každé ze skupin se přidá 5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 a kaše se umístí každá do malé kolony a ponechá se vytéci kapalná fáze. Pryskyřice se promyje přibližně třemi objemy 0,5 M Tris-HCl, pH 7 a promývací roztok se spojí s proteklou kapalinou. Eluované roztoky se zahustí a pufr se vymění za 20 mM citrátu sodného/100 mM chloridu sodného, pH 7,0 za použití Amicon ultrafiltračního zařízení majícího vylučovací mez molekulové hmotnosti 10 000. Koncentrované roztoky (asi 0,5 ml) pak procházejí 0,22 mikrometrovým filtrem z acetátu celulózy. Vzhledem 45 k analytické isoelektrické fokusaci bylo nalezeno pět skupin, obsahujících převážně jednotlivé isoformy 10, 11, 12, 13 a 14.

50 Ve třetí přípravě se na gel aplikuje asi 30 mg rekombinantního erythropoietinu ve 21,8 ml destilované vody a fokusuje se při 2 W po 25 minut, při 10 W po 20 hodin a 15 W 15 minut. Proužky proteinu, odpovídající individuálním isoformám jsou pozorovány vizuálně a odebrány z gelového lože. K isoformám izolovaných z gelu se přidá destilovaná voda, připraví se kaše a vzniklé supernatanty se analyzují analytickou isoelektrickou fokusací. Ke každé kaši se přidá stejný objem 1 M tris-HCl, pH 7,2, suspenze se umístí do oddělených malých kolon a kapalná fáze se nechá vytéci z kolony pro eluci isoformem. Každý výtok se zahustí a pufr se vymění za 55 20 mM sodný citrát/100 mM chlorid sodný, pH 7,0 za použití Amicon zařízení pro ultrafiltraci

s vylučovací mezi molekulové hmotnosti 10 000. Analytický isoelektrofokusační gel informuje o tom, že byly získány skupiny, obsahující zejména jednotlivé isoformy 9, 10, 11, 12, 13 a 14.

5 Čtvrtá příprava isoformy používá jako výchozí materiál erythropoietin, obsahující isoformy 3 – 9 (připravené výše). Před preparativní isoelektrickou fokusací provedenou v podstatě jak bylo popsáno výše pro přípravu 1 až 3, byly ampholyty (Pharmalyte 2,5–5) prefrakcionovány v Rotofor (Bio–Rad, Richmond, CA) buňce pro isoelektrickou fokusaci s kapalnou fází, pro získání ampholytů vhodnějších pro nižší isoelektrické body výchozího materiálu. Prefrakcionace se provádí smísením 6,7 ml Pharmalytu 2,5–5 s 15 g močoviny a přidáním vody na objem 50 ml. 10 Směs se frakcionuje v Rotoforu při 10 W 1 °C po 5 1/2 hodiny za použití 0,1M kyseliny fosforečné a 0,1 M hydroxidu sodného při anolytu a katolytu. Amfolytové frakce, mající zjištěné pH mezi 4,5 a asi 6 byly použity pro isoelektrickou fokusaci plochého lože.

15 Amfolyty byly získány z isoformem za použití Centrioluteru (Amicon, Danvers, MA) a 10000 MQ Centriconu (Amicon) za použití následujících parametrů: 0,18 Tris pufr 8,8, 100 Volt, 25–30 mA, po 3 hodiny. Isoformy byly pak pufrém převedeny do 0,1 M chloridu sodného gelovou filtrací za použití Sephadexu G–25 (Pharmacia). Analytická isoelektrická fokusace pěti výsledných ppolů prokázala, že obsahují isoformy 4, 5, 6, 7 a 8. Isoforma 4 vykazuje několik proužků což indikuje, že prošla určitou degradací.

20 Příprava páté isoformy byla modifikována přidavkem prefokusačního stupně k postupu isoelektrické fokusace na plochem loži. V této modifikaci nebyl přidán protein ke směsi amfolyt/močovina/gel před elektroforézou, ale byl přidán do isoelektrického fokusačního zařízení s následujícím vývojem gradientu pH v gelovém loži. Po prefokusaci po 75 minut (1500 volt/h) 25 byly sekce gelového lože ve vzdálenosti 2,25 – 4,25 cm od katody odebrány, smíseny s roztokem erythropoietinu a přidány zpět ke gelovému loži. Po isoelektrické fokusaci byly isoformy 10, 11, 12, 13 a 14 eluovány z gelového lože a odděleny od amfolytů ultrafiltrací za použití zařízení Centricon–10 (Amicon).

30 Prefokusační modifikace byla uskutečněna pro to, aby charakteristiky ultrafialové absorbance přípravků, obsahujících isoformy byly podrobnější těmto charakteristikám výchozího rekombinantního erythropoietinu. Zlepšení ve spektrálních charakteristikách může být zřejmé z poměru absorbance při 280 a 260 nm u izolovaných isoformem. Průměrný poměr absorbance při 280 nm k absorbanci při 260 nm (A_{280}/A_{260}) pro isoformy z přípravků 2 a 3 (neprefokusované) je $1,36 \pm 0,11$, zatímco průměrný poměr A_{280}/A_{260} poměry jsou $1,39 \pm 0,11$ a $1,74 \pm 0,09$ pro přípravky 2 a 3 a 5 a 6. (Isoforma 14 může mít nejtypičtější spektrum, protože je přítomna v nejmenších množstvích a je tak více náchylná k interferencím stopovou kontaminací amfolytovými 35 komponentami nebo protože je nejbližší elektrodě během provádění isoelektrické fokusace na plochem loži.). Průměrný A_{280}/A_{260} poměr pro rekombinantní erythropoietin připravený podle příkladu 2 Laie a spol. (modifikovaný jak bylo popsáno použitím Q–Sepharosy jako aniontovýmenné pryskyřice) je $1,91 \pm 0,04$.

45 Jak je popsáno výše, výchozí materiál pro přípravu isoformy č. 6 byl rekombinantní erythropoietinový přípravek obsahující isoformy 4–13. Amfolyty byly pre–fokusovány v zařízení Rotofor jako ve čtvrté přípravě. Pro isoelektrickou fokusaci na plochem loži byly použity amfolytové frakce, mající pH mezi 3,7 a 4,8. Ploché lože bylo prefokusováno postupem jako v přípravě č. 5 a isoformy 9, 10, 11, 12 a 13 byly získány pro ultrafiltraci (Centricon–10) pro odstranění amfolytů.

50

Příklad 2

Obsah sialové kyseliny v isoformách rekombinantního erythropoietinu

5 Isoformy izolované jak bylo popsáno v příkladu 1 a erythropoietin čištěný postupy popsanými Laiem a spol., supra (směs isoform 9 až 14) jsou pufrům převedeny do 0,10 – 0,15 M chloridu sodného a analyzovány na obsah sialové kyseliny modifikací postupu podle Jourdiana a spol., J. Biol. Chem. 246, 430 (1971). Zbytky sialové kyseliny jsou odštěpeny od glykoproteinů
 10 hydrolyzou 0,35 M kyselinou sírovou při 80 °C po 30 minut a roztoky jsou neutralizovány hydroxidem sodným před analýzou. Za účelem vyhodnocení množství přítomného erythropoietinového proteinu se provede stanovení proteinu podle Bradforda (Bradford Anal. Biochem. 72, 248 (1976)) za použití rekombinantního erythropoietinu, majícího aminokyselinovou
 15 sekvenci lidského erythropoietinu jako standard za použití zkušebních reagensů a mikrozpůsobu podle Bio-Rad. Výsledky, vyjádřené jako moly sialové kyseliny na mol erythropoietinu, jsou uvedeny v tabulce 1. Isoformy jsou označeny podle počtu sialových kyselin na molekulu a rozsahu od málo kyselých (isoforma 9) do nejkyselejších (isoforma 13). Isoformy 9–13 jsou uvedeny v gelových drahách 6–10 obr. 1. Množství isoformy 14 jsou nedostatečná k přesnému
 20 měření obsahu sialové kyseliny. Obsah sialové kyseliny v této isoformě je odhadnut z její migrace na IEF gelech vzhledem k dalším isoformám. Obsah sialové kyseliny isoform 5–8 (přípravek č. 4) nebyl měřen, ale je pravděpodobně odhadnut z jejich migrací na IEF gelech.

Tabulka 1

<u>Isoforma erythropoietinu</u>	<u>mol sialové kyseliny / mol erythropoietinu</u>
isoforma 13	12,9 ± 0,5
isoforma 12	11,8 ± 0,2
isoforma 11	11,0 ± 0,2
isoforma 10	9,8 ± 0,3
isoforma 9	8,9 ± 0,6
směs isoformem (9–14)	11,3 ± 0,2

Příklad 3

30 Aktivita isoformem rekombinantního erythropoietinu

Isoformy izolované jak bylo popsáno v příkladu 1 byly hodnoceny podle absorbance při 280 nm, Bradfordovou proteinovou zkouškou a pomocí RIA pro erythropoietin pro stanovení množství
 35 přítomného rekombinantního erythropoietinu. Exhypoxická polycythemická biostudie na myších (Cotes a spol., Nature 191, 1065 (1961) se použije pro stanovení in vivo biologické aktivity. Kvantifikace množství erythropoietinového proteinu přítomného podle radioimunozkoušky pro erythropoietin poskytuje výsledky mající vyšší relativní in vivo specifickou aktivitu pro některé
 40 isoformy, protože zjevně snížená imunoreaktivita isoformem, obsahujících velké množství sialové kyseliny vede k podhodnocení koncentrace erythropoietinu a tak k nadhodnocení in vivo specifické aktivity pro nejvíce negativní isoformy. Stanovení z biostudie na myších, vyjádřené jako jednotka/ml, jsou děleny koncentracemi odpovídajících proteinů pro získání in vivo specifických aktivit vyjádřených jako jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu. Tyto specifické aktivity jsou uvedeny v tabulce 2.

45 V tabulce 2 je „n“ počet nezávislých přípravků isoformem, které spolupůsobí hodnotu specifické aktivity. V nejvíce případech byly provedeny in vivo studie pro každý přípravek isoformy. Některé in vivo údaje pomáhají při výpočtech specifické aktivity ve všech třech sloupcích.

Jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu byly stanoveny z absorbance při 280 nm, z hodnot radioimuno zkoušky nebo z výsledků Bradfordovy proteinové zkoušky. Čištěný rekombinantní erythropoietin, obsahující isoformy 9–14 byl použit jako standard v Bradfordově proteinové zkoušce. „n“ může být menší pro výpočty provedené za použití Bradfordovy proteinové zkoušky, protože některé přípravky nebyly v době provádění Bradfordovy zkoušky dostupné.

Erythropoietin čištěný podle postupů popsaných Laiem a spol., supra a obsahující směs isoformem 9 až 14 byl použit jako standard ve zkouškách RIA a in vivo.

Relativní specifické aktivity vyjádřené jako jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu mohou být převedeny na jednotky/A280 násobením 0,807 mg erythropoietinového polypeptidu/A280. Přepočítávací faktor je získán násobením extinkčního koeficientu erythropoietinu (1,345 mg/A280) obsahem proteinu v erythropoietinovém glykoproteinu (asi 60 % hmotnostních, Davis a spol., Biochemistry 26, 2633 (1987)) pro vyjádření mg erythropoietinového polypeptidu/A280 (tj. 1,345 mg erythropoietinu/A280 x 0,60 mg polypeptidu/mg erythropoietinu = 0,807 mg polypeptidu/A280). Dále specifické aktivity vyjádřené jako jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu mohou být násobeny faktorem 0,60 mg polypeptidu/mg erythropoietinového glykoproteinu pro získání specifických aktivit vyjádřených jako jednotky/mg erythropoietinového glykoproteinu.

Tabulka 2

Isoforma	U/mg polypeptidu (Bradfordova proteinová zkouška)	n	U/mg polypeptidu (z A280)	n	U/mg polypeptidu (z RIA)	n
14	289,400 ± 3,100	2	205,800 ± 37,700	2	366,700 ± 55,900	2
13	307,600 ± 30,600	4	258,700 ± 59,500	5	337,200 ± 40,200	5
12	275,200 ± 55,600	4	258,400 ± 41,700	5	287,700 ± 42,600	5
11	282,700 ± 41,100	3	255,800 ± 67,300	4	251,400 ± 62,700	4
10	188,000 ± 1,900	1	170,300 ± 34,500	3	171,900 ± 31,600	3
9			96,600 ± 46,700	2	113,600 ± 39,600	2
8	65,200 ± 3,800	1	70,600 ± 4,100	1	61,000 ± 3,500	1
7	46,200 ± 5,800	1	50,300 ± 6,300	1	42,800 ± 5,400	1
5	16,600 ± 1,700	1	18,300 ± 1,900	1	15,500 ± 1,600	1

Údaje z tabulky 2 jsou také znázorněny na obr. 2A, 2B a 2C. Tyto údaje ukazují, že relativní in vivo aktivita erythropoietinu se zvyšuje jako funkce obsahu sialové kyseliny až do isoformy č. 11. Isoformy č. 11–14 mají v podstatě stejnou relativní in vivo bioaktivitu. (To je nejzjevnější, jestliže je koncentrace isoformy 14 vyjádřena použitím hodnoty z Bradfordovy zkoušky. Bradfordova hodnota může být pro isoformu 14 přesnější, protože jsou obecně získány nižší hodnoty a to vede k obtížím při stanovení pomocí A280 a nejzřejmějšímu snížení reaktivity v RIA pro velmi negativní formy, jak bylo uvedeno dříve). Vyšší in vivo specifická aktivita erythropoietinových isoformem, majících více sialových kyselin je nejpravděpodobněji způsobena delším průběhem poločasu životnosti těchto forem. Isoformy 9 a 13 jsou značeny radioaktivním jodem (¹²⁵I) a byla stanovena rychlost jejich štěpení u krys. Poločas životnosti v oběhu byl výrazně delší pro isoformu 13 než pro isoformu 9.

Příklad 4

Dělení směsí isoformem rekombinantního erythropoietinu chromatografií na Q-Sepharose

5

Buněčná kondiciovaná média z produkce rekombinantního erythropoietinu podle postupů popsaných Linem, supra, se koncentruje a diafiltrují proti 10 mM Tris, pH 7,2. Koncentrace proteinu se stanoví Bradfordovou mikroproteinovou zkouškou za použití hovězího sírového albuminu jako standardu. 19,6 ml roztoku, obsahujícího 40 mg celkového proteinu se připraví ve 20 μ M CuSO₄, filtruje přes 0,45 mikrometrový filtr a vloží na 4ml kolonu (1,05 cm výška x 2,2 cm průměr) plněnou náplní Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia), která byla ekvilibrována 10 mM Tris, pH 6,8 až 7,0 při 4 °C. Po aplikaci vzorku se kolona promyje dvěma objemy kolony pufru. Průtok kolony je asi 1 ml/min. Pro dělení směsí isoformem erythropoietinu se použije šest oddělených kolon.

15

Kolony se promyjí 6 až 9 objemy pufru o nízké pH: kolona č. 1, 150 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO₄, 6 M močovina, upraveno na pH 4,7 NaOH, kolona č. 2, 200 mM octová kyselina, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO₄, 6 M močovina, upraveno na pH 4,7 NaOH, kolona č. 3, 250 mM octová kyselina, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO₄, 6 M močovina upraveno na pH 4,7 NaOH, kolona č. 4, 300 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO₄, 6 M močovina upraveno na pH 4,7 pomocí NaOH, kolona č. 5, 150 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO₄, 6 M močovina, kolona č. 6, 300 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO₄, 6 M močovina. pH kolon se zvyšuje na asi pH 7 promýváním každé kolony 8 až 11 objemy kolony 10 mM Tris-HCl, 55 mM NaCl, 20 μ M CuSO₄, pH 7. Definované erythropoietinové isoformové směsi jsou z kolon eluovány promýváním 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 20 μ M CuSO₄, pH 7,0.

25

Eluované isoformové pooly z každé kolony se zahustí a rozpouštědlo se vymění vodou za použití Amico Centricon- 10 mikrokoncentrátoru. Výsledky analytické isoelektrické fokusace těchto koncentrovaných poolů jsou uvedeny na obr. 3. Gelové dráhy 1-6 představují definované směsi erythropoietinových isoformem eluovaných z kolon 1-6. „Isoformiová směs“ uvedená v poslední pravé dráze gelu na obr. 3 představuje buněčné médium, které je aplikováno na kolonu Q-Sepharosy jak je popsáno výše, kolona se promyje 5 mM kyseliny octové, 1 mM glycinu, 20 μ M CuSO₄, 6M močoviny a směs isoformem erythropoietinu se eluuje z kolony za použití výše popsaných postupů. Tato eluovaná směs isoformem se dále čistí podle postupů popsaných v práci Laie a spol., supra, před analytickou isoelektrickou fokusací.

35

Příklad 5

40

Frakcionace isoformem rekombinantního erythropoietinu za použití nízké pH gradientu na Q-Sepharose

V dalším postupu jsou isoformy erythropoietinu separovány za použití gradientu se snižováním, pH a zvyšováním iontové síly. Koncentrované diafiltrované, erythropoietin obsahující médium se vnese na kolonu Q-Sepharosy v poměru asi 40 mg celkového proteinu/ml gelu. Kolona se pak promyje asi dvěma objemy kolony 10 mM Tris HCl, pH 7,0 a pak asi 10 objemy kolony 2 mM kyseliny octové/1 mM glycinu/20 μ M CuSO₄/6 M močoviny (pH přibližně 4,8) pro odstranění kontaminujících proteinů a erythropoietinových isoformem, obsahujících méně než asi 7 zbytků sialové kyseliny. Isoformy, obsahující od přibližně 8 do přibližně 12 sialových kyselin jsou z kolony eluovány za použití gradientu od počátku 2 mM kyseliny octové v 6 M močoviny/1 mM glycinu/ 20 μ M CuSO₄ a do až 40 mM kyseliny octové/6 M močoviny/1 mM glycinu/20 μ M CuSO₄ (pH přibližně 4). Celkový objem gradientu je přibližně 40 objemů kolony a frakce přibližně jednoho objemu kolony se odebírají do nádob, obsahujících objem Tris pufru

50

dostačující k uvedení pH do rozmezí 6 – 8,5 proto, aby se zabránilo dlouhodobému vytavení odebraných frakcí nízkému pH. Podíly frakcí se podrobí analytické isoelektrické fokusaci pro sledování separace. Obr. 4 ukazuje separaci isoform 8–11, které může být dosaženo tímto postupem. Isoformy 12 – 14, které zůstávají vázány na koloně při konci gradientu, jsou eluovány promýváním pufrům, obsahujícím 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 20 μ M CuSO₄ (pH 7,0). Isoformy (separované působením gradientu nebo eluované roztokem chloridu sodného) jsou prosté kontaminujících proteinů při chromatografii na reverzní fázi, následované filtrační gelovou chromatografií jak je popsáno v příkladu 2 v práci Laie a spol.

10

Příklad 6

Analogy lidského erythropoietinu, mající další glykosylační místa

15

A. Konstrukce analogů lidského erythropoietinu

Umístění existujících a navržených míst pro připojení karbohydrátu v erythropoietinové aminokyselinové sekvenci jsou uvedena na obr. 5 a postup přípravy těchto dalších glykosylačních míst je shrnut na obrázcích 6A–C a je popsán dále.

20

Za použití *in vitro* mutagenese byly syntetizovány následující oligonukleotidové primery:

/Asn⁴, Ser⁶/EPO: 5'CGCCCACCAAACCTCAGCTGTGACAGCCGA 3'
 /Asn⁹, Ser¹¹/EPO: 5'ATCTGTACAACCGAAGCCTGGAGAGGT 3'
 25 /Asn⁶⁹/EPO: 5'GGGCTGGCCAACTGTCGGAAG 3'
 /Asn¹²⁴/EPO: 5'TCCCCTCCAGATAATGCCTCAGCTGC 3'
 /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO: 5'CAGATGCGAACTCATCTGCTCCAC 3'
 /Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵/EPO: 5'AGGCCTGAGGAATGGGAGCAGATGACCAGGTTG 3'
 /Thr¹²⁵/EPO: 5'TCCAGATGCGACCTCAGCTGCTC 3'
 30 /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO: 5'CCTCCAGATCCGACCTCAGCTGC 3'

Podtržené kodony představují oblasti chybného párování, kde aminokyseliny uvedené v závorkách nahrazují divoký typ aminokyselin.

35 /Asn⁴, Ser⁶/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa u Asn 4. /Asn⁹, Ser¹¹/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa k Asn 9. /Asn⁶⁹/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa k Asn 69. /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa k Asn 125. /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO byly konstruovány přidáním O-glykosylačního místa u Thr 125.

40

Následující oligonukleotidové primery jsou syntetizovány za použití *in vitro* mutagenese:

/Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO: 5'GGGCCTGGCCAACTGACAGAAGCTGTC 3'
 /Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO: 5'CAGGCCCTGTCCAACCTGACAGAAGCTGTC 3'
 45 /Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO: 5'CAGATGCGAACTCAACGGCTCCAG 3'
 /Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹/EPO: 5'ATGCGAACTCAACGGCTCCACTCACAACAATCACT 3'
 /Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO: 5'CCAGATCCAATTCATCTGCTCCACTC 3'
 /Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO: 5'CCAGATCCAATTC AACAGCTCCACTC 3'
 /Thr¹²⁵, Thr¹²⁶/EPO: 5'CCAGATGCGACAACAGCTGCTCCA 3'
 50 /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹/EPO:

Oligonukleotidový primer 5'AGATCCGACCACCGCTGCTCCAC 3' je použit pro přípravu /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶/EPO za použití /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO cDNA jako výchozí látky. Oligonukleotidový primer 5'TGCTCCACTCACAACAATCACTG 3' je pak použit pro přípravu /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹/EPO.

/Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO a /Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO jsou konstruovány přidáním N-glykosylačního místa k Asn 69 a zvýšením N-glykosylace na tomto místě. /Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO, /Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹/EPO, /Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO a /Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO jsou konstruovány přidáním N-glykosylačního místa na Asn 125 a zvýšením glykosylace na tomto místě /Thr¹²⁵, Thr¹²⁶/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Ser¹³¹/EPO jsou konstruovány přidáním O-glykosylačního místa ke Thr 125 a zvýšením glykosylace na tomto místě.

Zdrojem erythropoietinové DNA pro in vitro mutagenesi byl plasmid Hu13, klon cDNA lidského erythropoietinu v pUC 8 (Law a spol. Proc Natl. Acad. Sci. 83, 6920 (1986)). Plasmidová DNA odvozená od Hu13 byla štěpena BstEII a BglII restričními enzymy, výsledné fragmenty DNA byly podrobeny elektroforéze na agarosovém gelu za použití GeneCleanTM kitu a postupy doporučenými výrobcem (BIO 101, Inc.) Plasmid pBRgHuEPO obsahuje erythropoietinový genomový gen jako BamHI fragment inzertovaný do derivátu pBR322, jak je popsáno ve zveřejněném patentu Lina, Supra. pBRgHuEPO byl také štěpen pomocí BstEII a BglII a byl získán vektorovým fragment 6517 bp. Ligace těchto dvou fragmentů vede k IGT1. Pro konstrukci pEC-1, byl pDSVL (popsaný ve zveřejněném patentu Lina, supra), štěpen BamHI a k němu byl ligován izolovaný BamHI fragment velikosti 2,8 kilobází (kb) z IGT1, obsahující erythropoietinovou cDNA.

Za účelem přípravy jednořetězcové DNA pro mutagenesi in vitro, byl pEC-1 štěpen BamHI a BglII a byl izolován fragment 820 bp erythropoietinové cDNA. Byl ligován k BamHI místu m13mp18 za vzniku m13-EC-1. Jednořetězcová DNA byla získána ze supernatantů E. coli kmen RZ1032, infikovaného m13-EC-1 jak popsal Kunkel a spol. Methods in Enzymol. 154, 367 (1987) a Messing, methods in Enzymol. 101, 20 (1983). Pro mutagenesi in vitro bylo smíšeno přibližně 1 µg jednořetězcové DNA a 0,2 pmol jednoho ze syntetických primerů popsaných výše se 6 ml pufru (250 mM Tris pH 7,8, 50 mM MgCl₂ a 50 ml dithiothreitolu). Pro připojení primeru k templátu byl objem reakční směsi upraven na 10 µl vodou, směs byla zahřívána na 65 °C po dobu 5 minut a pak nechána zchladnout na teplotu místnosti. Pro prodlužovací reakci bylo přidáno 2,5 ml dTTP, dATP, dGTP a ATP (všechny s 10 µM), dále 1 µl (1 jednotka) E. coli DNA polymerázy (Klenowův fragment) a 1 µl (1 jednotka) T4 DNA ligázy. Směs pak byla inkubována přes noc při 14 °C a použita pro transformování E. coli JM 109 (Yanish-Perron a spol., Gene 33, 103 (1985)) jak je popsáno (Messing, supra).

Pro identifikaci mutantních klonů rozlišovací hybridizací, byly plaky na nutričním agaru přeneseny na Gene Screen filtry (New England Nuclear). Filtry byly sušeny pod tepelnou lampou a pak inkubovány po dobu jedné hodiny v 6x SSC, obsahujícím 1 % SDS při 60 °C. Po hybridizaci byly oligonukleotidové primery uvedené výše (8 pmol) koncově označeny T4 polynukleotidovou kinázou a $\gamma^{32}\text{P}$ -označeným ATP a inkubovány s filtry přes noc v 6x SSC, 0,5% SDS a 100 mg/ml DNA losího sperma při 37 °C pro /Asn¹²⁴/mutaci, 55 °C pro /Asn⁴, Ser⁶/mutaci, 65 °C pro /Thr¹²⁵/ a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/ mutace a 70 °C pro /Asn⁹, Ser¹¹/ a /As¹⁶³, Ser¹⁶⁵/ mutace. Příští den byly filtry třikrát promyty 6x SSC při teplotě místnosti a podrobeny autoradiografii. Je-li to nutné byly pak filtry promyty 6x SSC při zvýšených teplotách, dokud nebyla detekována malá nebo žádná hybridizace u plaků, majících erythropoietinovou cDNA sekvenci divokého typu. Klony, které za těchto podmínek dávají pozitivní hybridizační signály byl identifikovány a retransfektovány do JM109 k izolování čistého klonu. Dideoxy řetězcová terminační sekvenční analýza dokládá, že jsou přítomny mutace u asparaginového, serinového, threoninového a prolinového zbytku.

Dvořetězcové m13 EC-1 DNA nesoucí /Asn⁴, Ser⁶/, /Asn⁹, Ser¹¹/, /Asn⁶⁹/, /Asn¹²⁴/, /Asn¹²⁵, /Ser¹²⁷/, /Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵/ /Thr¹²⁵/ a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/ změny byly získány z JM109 transfektovaných buněk vaznou metodou (Holmes a spol., Anal. Biochem. 117, 193 (1981)). DNA byly štěpeny pomocí BstEII a XhoII a byl izolován 810 bp fragmenty erythropoietinové DNA. pEC-1 byly štěpeny BstEII s následujícím parciálním štěpením BglII a 5'konce výsledných fragmentů se

defosforylují bakteriální alkalickou fosfatázou v 10 mM Tris, pH 8 při 60 °C po 60 minut. Byl izolován 7 kb vektorový fragment postrádající 810 bp BstEII-BglIII a ligován k erythropoietinovým fragmentům uvedeným výše. Výsledné plasmidy (označené pEC-X, kde X znamená parciální mutaci) obsahují lidský erythropoietin se změněnými aminokyselinovými zbytky v označených pozicích.

cDNA klony sekvence lidského erythropoietinu a analogů odpovídajících /Asn⁴, Ser⁶/, /Asn⁹, Ser¹¹/, /Asn⁶⁹/, /Asn¹²⁴/, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/, /Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵/, /Thr¹²⁵/ a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵P erythropoietinových cDNA klonů byly transfektovány do COS-1 buněk (ATCC č. CRL-1650) elektrokorporací. COS-1 buňky byly z polotekutých disků odebrány, promyty médiem (modifikované Dulbecco základní médium, obsahující 5 % fetálního telecího séra a 1 % L-glutaminu/penicilinu/ streptomycinu (Irvine Scientific) a resuspendují na 4 x 10⁶ buněk/ml. Jeden mililitr buněk se přenese do elektroporační kyvety (Bio-Rad) a elektroporuje Bio-Rad Gene PulseremTM při 25 μF a 1600 V za přítomnosti 100 až 200 μg nosiče DNA a 2 až 20 μg plasmidové DNA kodující erythropoietinový analog. Elektroporané buňky se umístí v koncentraci 2 x 10⁶ buněk na 60 mm misku pro tkáňovou kulturu a 5 ml média. Po dvou až čtyřech hodinách po umístění se médium nahradí 5 ml čerstvého média. Kondicionované médium se oddělí 3 až 5 dnů po elektroporaci.

20 A. Zkouška aktivity erythropoietinového analogu

RIA byly provedeny podle Egria a spol., supra. In vivo biologická aktivita erythropoietinových analogů byla stanovena ethypoxickou polycythemickou biostudií na myších (Cotes a spol., supra).

25 In vitro erythropoietinová aktivita byla stanovena zkouškou tvorby erythroidních kolonií jak je popsáno Iscovem a spol., J. Cell Physiol. 83, 309-320 (1974) s modifikacemi. Jednojaderné buňky z buněk lidské kostní dřeně byly částečně čištěny na „focol-pague“ vložce a promyty Iscovým médiem před umístěním na plotnu pro odstranění adherentních buněk. Kultivační 30 médium obsahuje 0,9 % methylcelulózy a neobsahuje jakýkoliv hovězí sérový albumin. Erythroidní kolonie byly spočteny po 8 až 10 dnech kultivace.

Erythropoietinové analogy transfektované a exprimované v COS buňkách jak je popsáno v sekci A, byly analyzovány v surových supernatantech COS buněk pomocí RIA a zkouškou tvorby erythroidních kolonií. Lidské erythropoietinová sekvence má in vitro aktivitu srovnatelnou s RIA 35 aktivitou stanovenou ve výše uvedeném pokusu. Analogy /Asn⁶⁹/EPO, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO, /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO vykazují in vitro aktivitu srovnatelnou s RIA aktivitou a poskytuje důkaz o dalších karbohydrátových řetězcích (jak je stanoveno v sekci C). Tyto analogy jsou dále analyzovány transfekcí cDNA klonem kodujícím erythropoietinový analog do 40 CHO buněk, čištěním erythropoietinového analogu a měřením in vivo biologické aktivity čištěného analogu.

C. Analýza Western Blot

45 Objem supernatantu, obsahující 5-20 jednotek z COS buněk transfektovaných cDNA erythropoietinových analogů jak je popsáno v sekci A, byl imunoprecipitován přes noc při teplotě místnosti s králičí antierythropoietinovou polyklonální protilátkou. K imunoprecipitátu bylo přidáno 20 až 80 μl 1:1 proteinu A-Sepharosy v salinickém roztoku pufrovaném fosfátem (PBS) a ponecháno inkubovat jednu hodinu při teplotě místnosti. Vzorky byly odstředěny, promyty PBS 50 a kde je to indikováno, byla peleta zpracována s N-glykanázou pro odstranění N-vázaného karbohydrátového řetězce. Vzorky byly analyzovány elektroforézou na 15% SDS-polyakrylamidovém gelu, přeneseny na nitrocelulózu a podrobeny Westernově analýze jak je popsáno (Burnette a spol., Anal. Biochem. 112, 195-203 (1981); Elliot a spol. Gene 79, 167-180 (1989)) za použití směsi myších antierythropoietinových monoklonálních protilátek.

Jedna z takových protilátek, 9G8A, je popsána Elliotem a spol. (1989) Blood 74, Supp. 1, A. 1228.

Analýza supernatantů COS buněk transfektovaných /Asn⁶⁹/ EPO a /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO cDNA dokládá zvýšení velikosti proteinu ve srovnání se sekvencí lidského erythropoietinu. Zvýšená velikost svědčí o přítomnosti dalšího N-vázaného karbohydrátového řetězce (obr. 7). Zpracování supernatantů z COS buněk transfektovaných /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/ EPO cDNA s N-glykanázou dokládá zvětšenou velikost proteinu ve srovnání se sekvencí lidského erythropoietinu. Tato zvětšená velikost svědčí o přítomnosti dalšího O-vázaného karbohydrátového řetězce (obr. 8).

D. Izolace isoform erythropoietinových analogů

Erythropoietinový analog /Thr¹²⁵/EPO byl konstruován jak je popsáno v sekci A. 810 bp fragment erythropoietinové cDNA nesoucí /Thr¹²⁵/mutaci byl izolován štěpením plasmidu pEC obsahujícího /Thr¹²⁵/ mutaci pomocí BstEII a BglII a ligací fragmentu k pDEC Δ byl připraven z pDS α 2 následujícími kroky:

1) HindIII místo pDS α2 bylo deletováno štěpením pDS α 2 DNA pomocí HindIII, zpracováním HindIII kohezivních konců s E. coli DNA polymerázou (Klenow fragment) a dNTP, a eligací tupě zakončeného vektoru. Výsledný plasmid je pDS α2 ΔH.

2) pDS α2 ΔH byl štěpen pomocí Sall a syntetický oligonukleotid mající SV40 „splice“ signál se Sall linkerem připojeným ke 3' konci „splice“ signálu byl k němu ligován. Syntetický oligonukleotid měl následující sekvenci:

```
5' TCGAGGAACTGAAAAACCACAAAGTAACTGGTAAGTTTAGT
CTTTTGTCTTTTTATTTCAGGTCCTGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCA
AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCAGTACGG
AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGGAACAAGCTGGTTCGACC 3'
```

Výsledný plasmid byl pDS α2 Δ H spoj.

3) pDS α2 ΔH spoj byl štěpen Sall a konce zpracovány na tupo zpracováním s kohezivními konci T4 DNA polymerázou a dNTP. 820 bp fragment BamHI-BglII lidské erythropoietinové cDNA byl na koncích natupo zpracován stejným postupem a ligován k plasmidu. Výsledný plasmid byl pDEC.

4) pDEC byl štěpen s KpnI a pVUII a na koncích zpracován na tupo zpracováním s kohezivními konci „mung bean“ nukleázo. Plasmid byl ligován k deletovanému excisovanému KpnI-PvUII fragmentu za vzniku plasmidu pDEC Δ.

Plasmid pDECΔ, obsahující /Thr¹²⁵/ erythropoietinovou cDNA byl transfektován do -deficientních CHO buněk. 770 ml kondiciovaného média CHO buněk byl zakoncentrován za použití membrány s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10 000 a diafiltrován proti 10 mM Tris-HCl, pH 8,6 na celkový objem 34 ml. 17ml podíl koncentrátu byl nanesen na Q-Sepharosovou kolonu s rychlým průtokem (5 ml objem náplně) ekvilibrovanou stejným pufrem a eluován lineárním gradientem 0-250 mM NaCl v 10 mM Tris-HCl, pH 8,6. Podíl frakcí z kolony, buď nezpracované, nebo štěpené N-glykanázou, byly analyzovány SDS-PAGE nebo IEF a pooly (označené 2,3 a 4) byly připraveny na bázi isoformy a/nebo karbohydrátového složení frakcí. Každý pool byl nanesen na Vydac C4 kolonu (214TPB 2030, 1 cm průměr, 1,8-2,5 ml objem náplně, 0,34 ml/min) a promyt dvěma objemy kolony 20% ethanolu v 10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Kolony byly eluovány lineárními gradienty 20-94% ethanolu, 10 mM Tris, pH 7,0. Pools byly připraveny, naředěny do 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 a naneseny na Q-Sepharosové kolony

s rychlým průtokem. Následujícím promýváním 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, byly vzorky eluovány 20 mM citrátem sodným, 250 mM NaCl, pH 7,0. Čištěné /Thr¹²⁵/ pooly byly analyzovány IEF a jsou uvedeny na obr. 9. EPO analog je analyzován na in vivo biologickou aktivitu jak je popsáno výše (Cotes a spol., supra).

5

Vynález je popsán svými výhodnými provedeními, která však nijak vynález neomezuji. naopak, jsou v něm zahrnuty různé modifikace a ekvivalenty v rámci připojených nároků, provedené v nejširším rozsahu tak, že zahrnují všechny takové modifikace a ekvivalenty.

10

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Způsob přípravy směsi erythropoietinových isoform, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se

20

a) vybere dvě nebo více erythropoietinových isoform, z nichž každá vykazuje jediný isoelektrický bod a má specifický počet sialových kyselin na isoformu erythropoietinu, kde uvedený počet je vybrán ze skupiny, zahrnující 1 až 14; a

b) tyto isoformy se smísí tak, aby výsledná směs vykazovala předem určený počet sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

25

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se ve stupni a) vyberou alespoň dvě isoformy mající méně než 12 sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se ve stupni a) vyberou isoformy mající 9, 10 a 11 sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

30

4. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se ve stupni a) vyberou alespoň dvě isoformy mající více než 11 sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

35

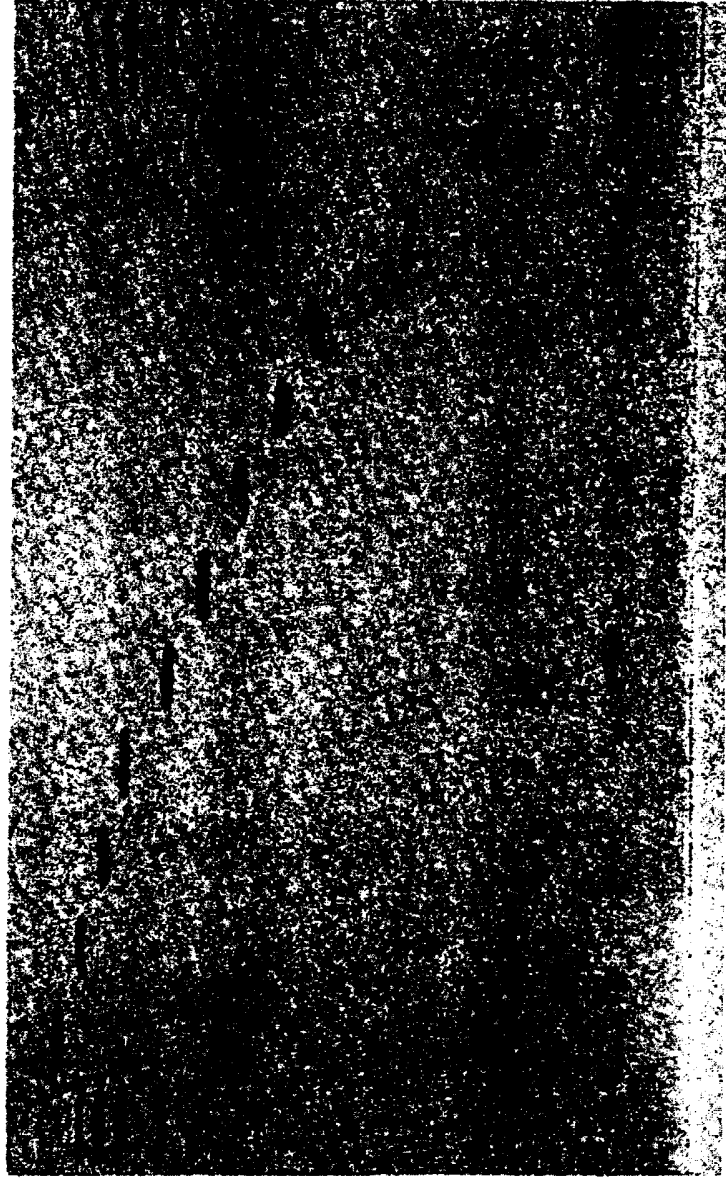
5. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se ve stupni a) vyberou isoformy mající 13 a 14 sialových kyselin na isoformu erythropoietinu.

40

13 výkresů

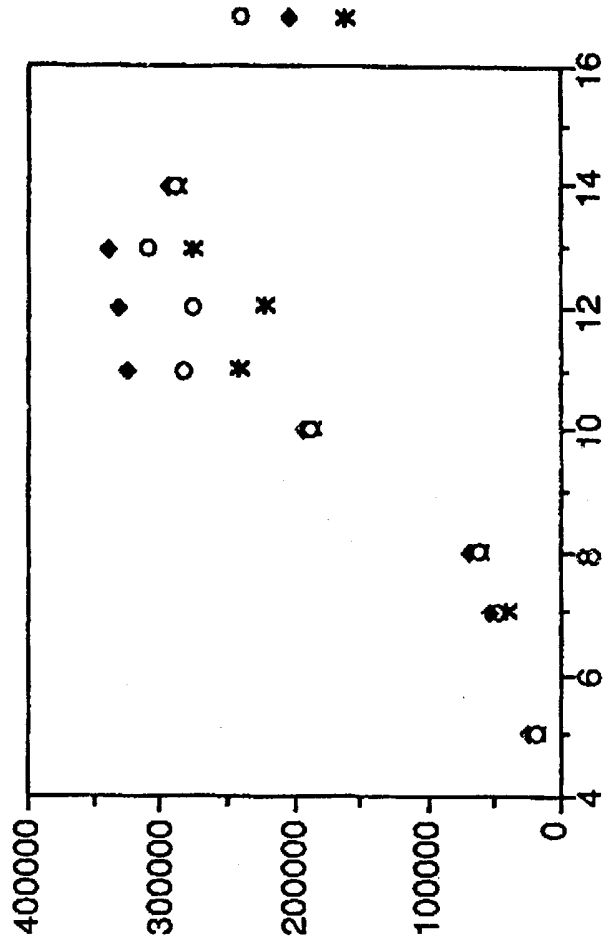
Obr. I

11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

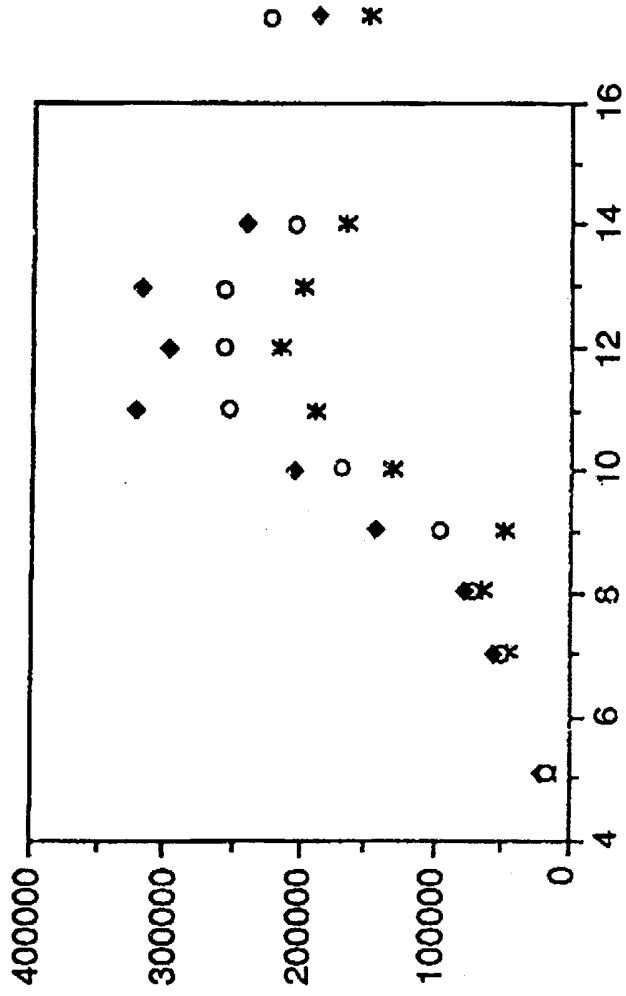


↑↑↑↑↑
14 13 12 11 10
↑↑↑↑
9 8 7 6
↑ ↑
5 4

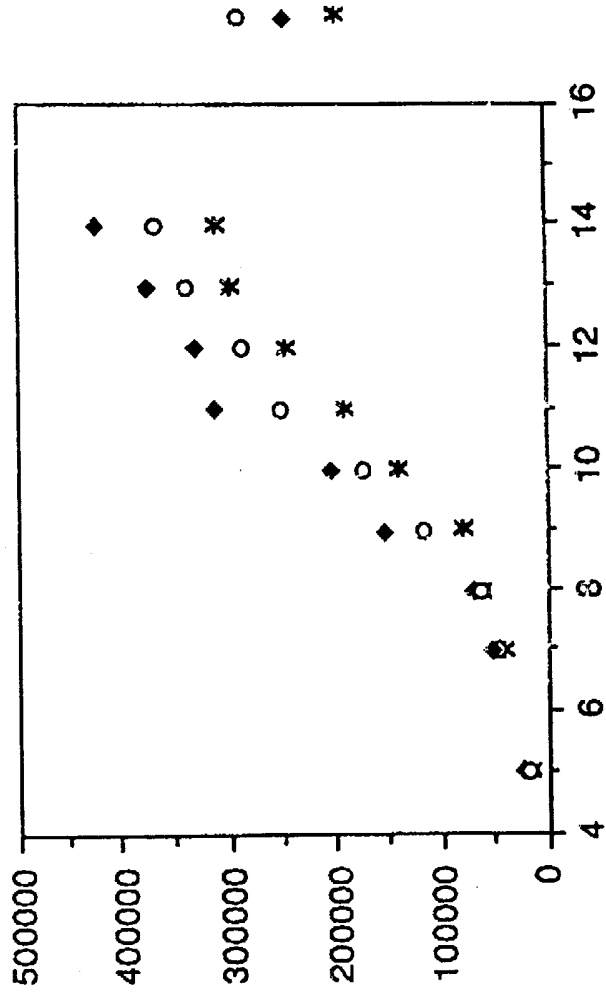
Obř. 2A



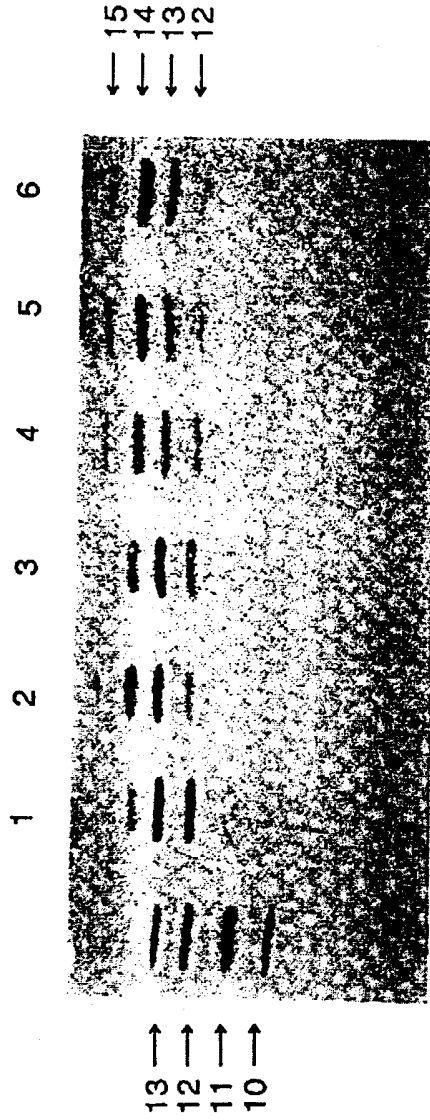
Obr.2B



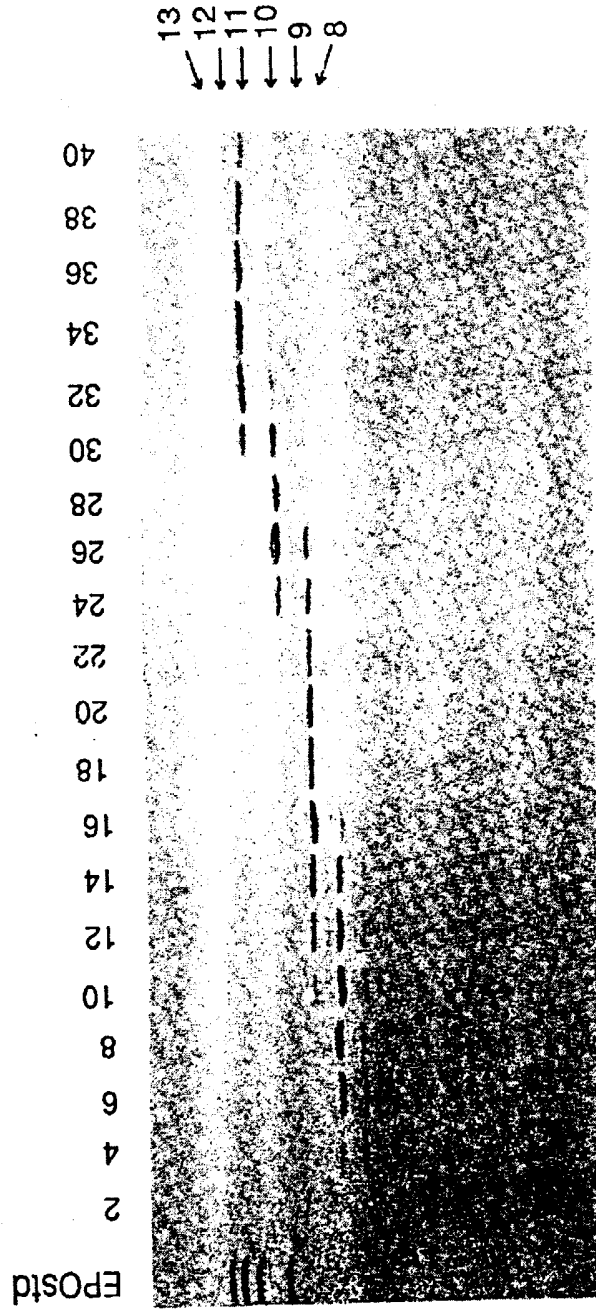
Obr. 2C



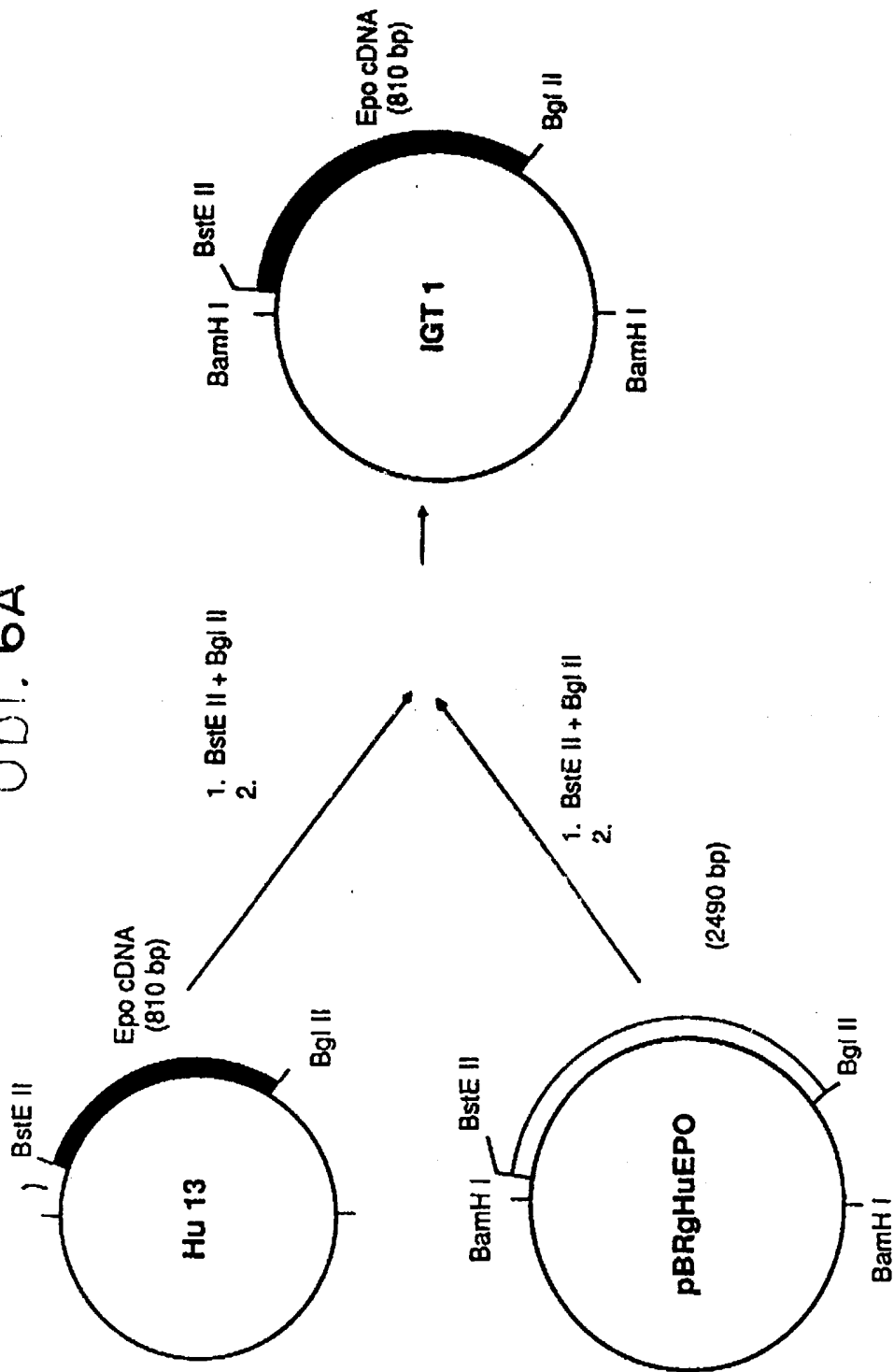
Obr. 3



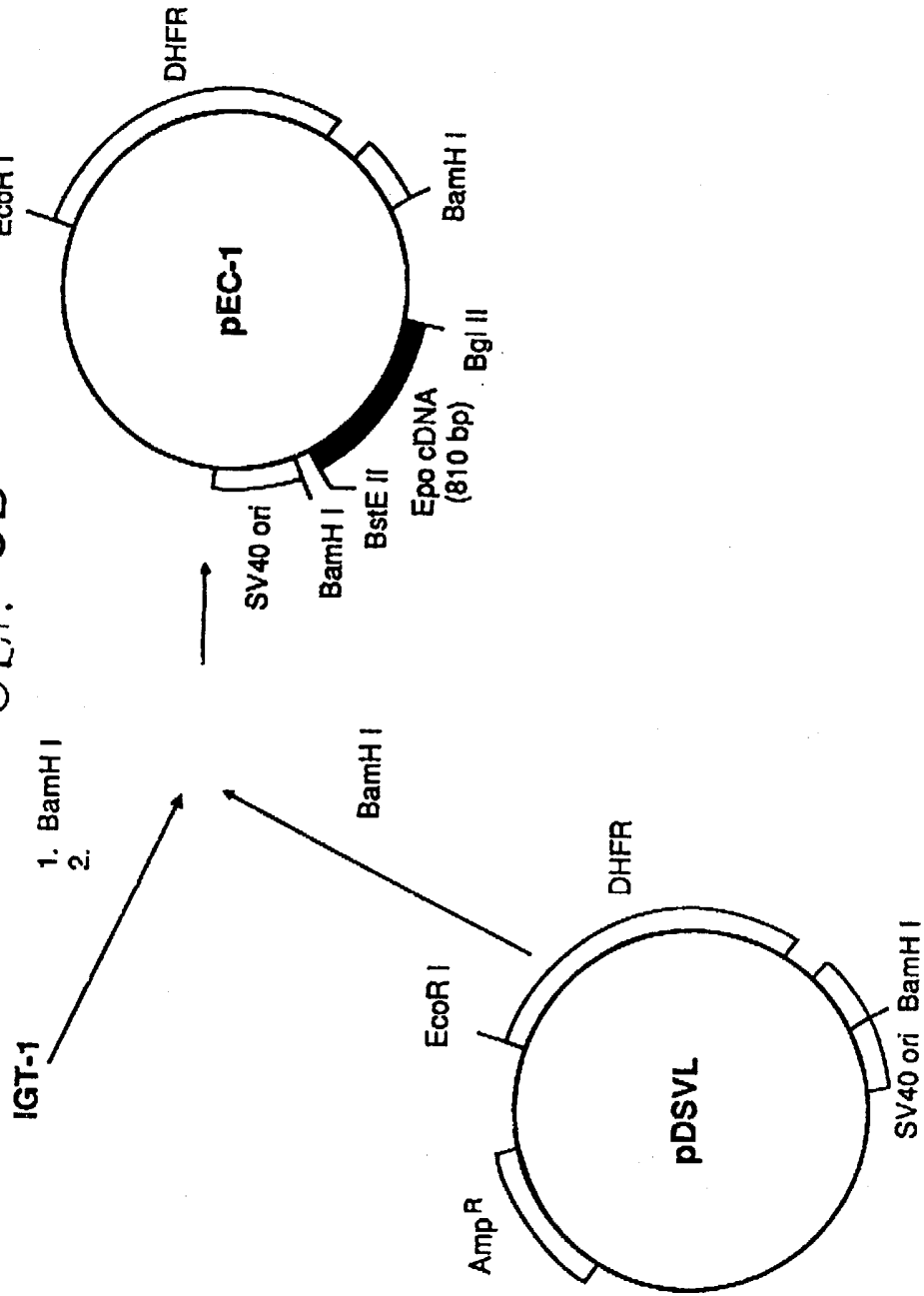
Obr. 4



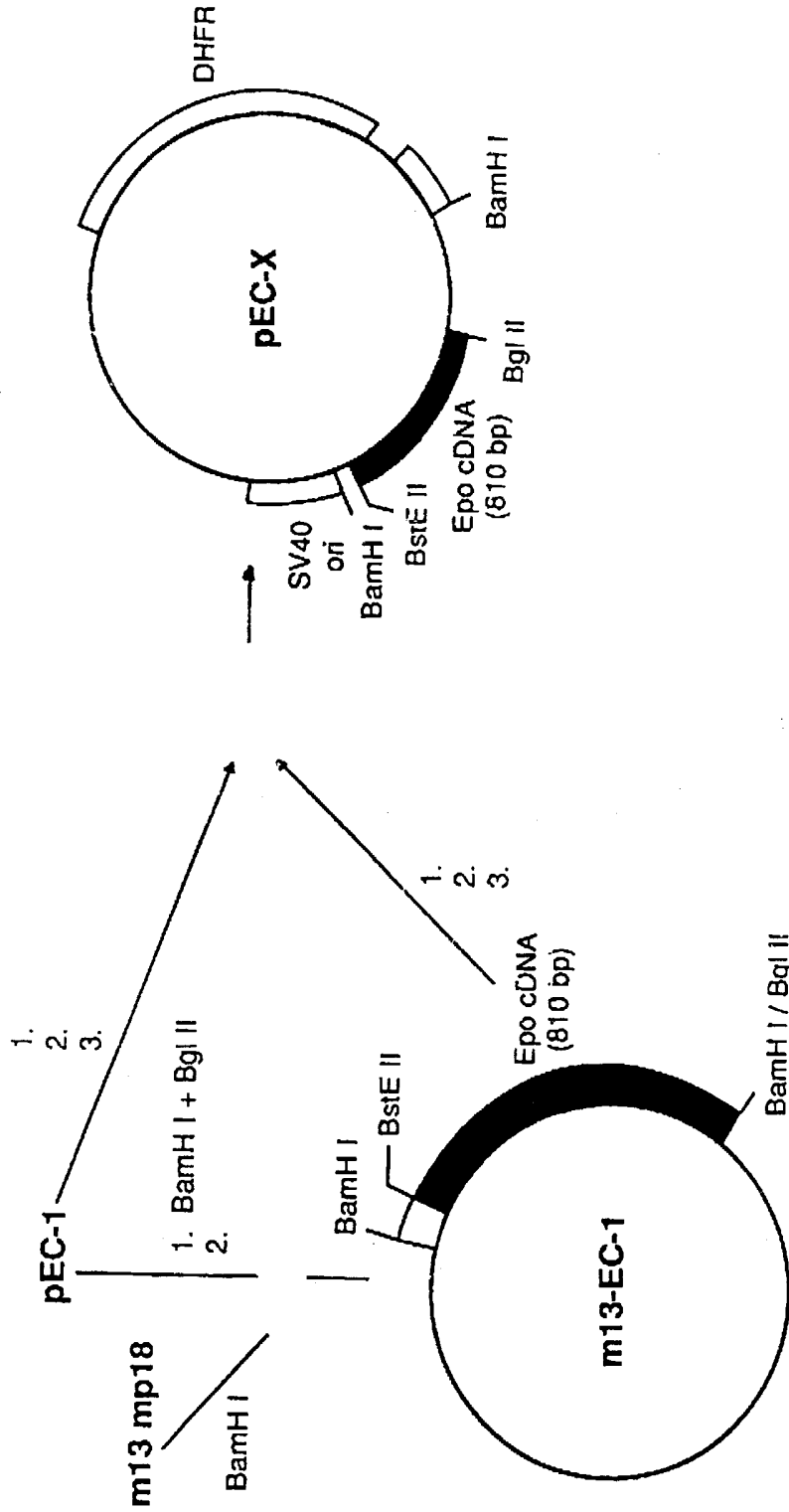
Obř. 6A



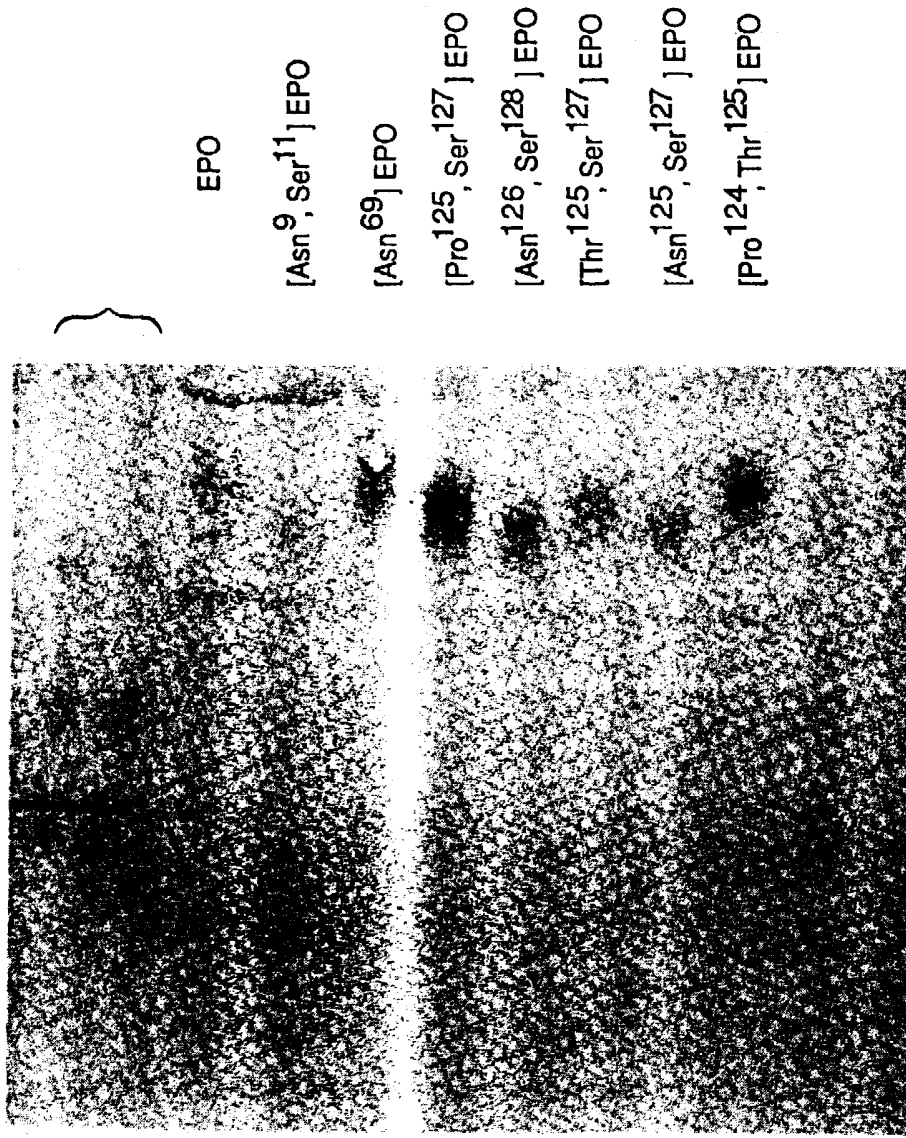
Obr. 6B



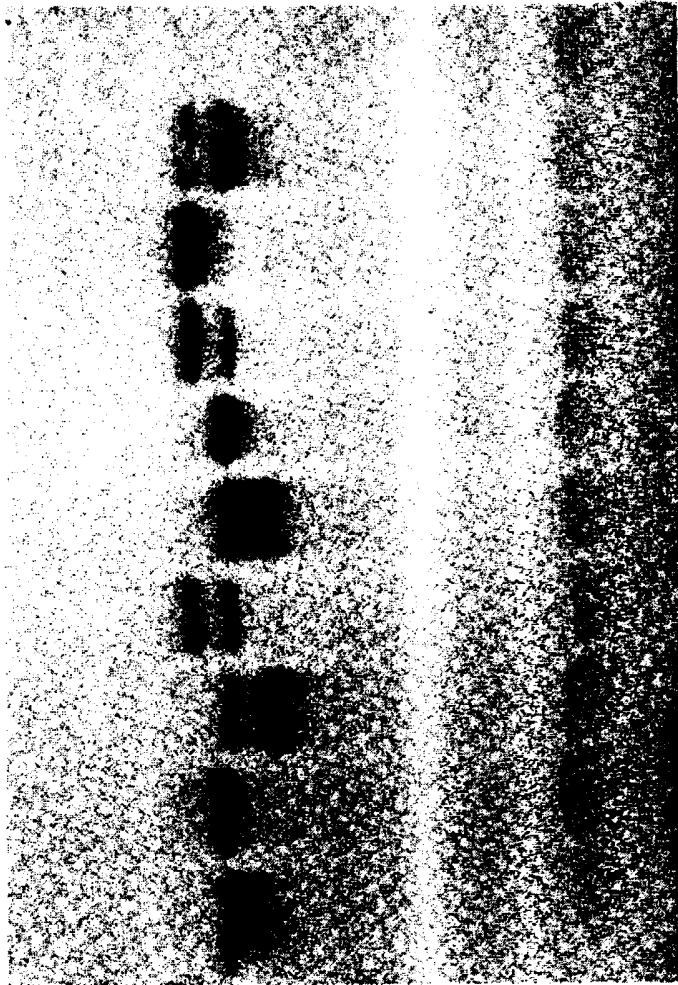
Obr. 6C



Obr. 7



Obr. 8



COS

EPO

[Val¹²⁶] EPO

[Pro¹²⁴] EPO

[Pro¹²⁵] EPO

[Thr¹²⁵] EPO

[Thr¹²⁷] EPO

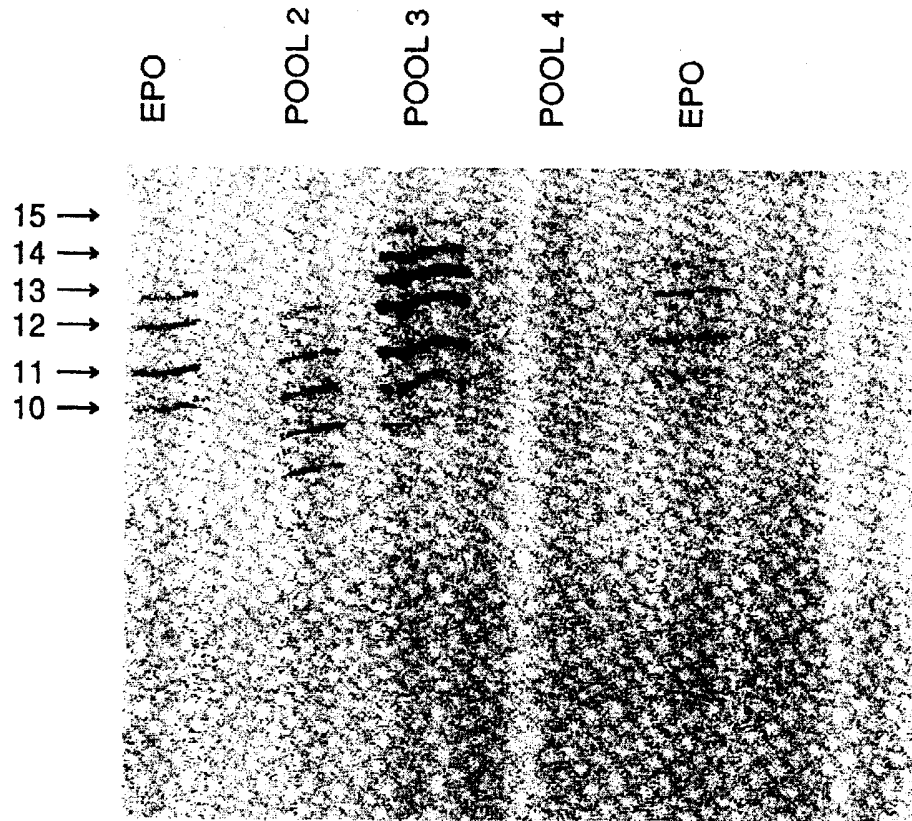
[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO

[Pro¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

[Thr¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

↑ ↑ ↑

Obr. 9



Konec dokumentu
