(19) DANMARK

(11) **DK 173067 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl[6].: **C 07 K 14/505** **C 12 N 15/12** **C 12 N 15/85**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1987 03093**

(22) Indleveringsdag: **1987-06-17**

(24) Løbedag: **1987-06-17**

(41) Alm. tilgængelig: **1987-12-28**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **1999-12-13**

(30) Prioritet: **1986-06-27 US 879423**

(73) Patenthaver: **Board of Regents of the University of Washington, 201 Administration Building AG-10, The Graduate School, Seattle, Washington 98195, USA**

(72) Opfinder: **Jerry S. Powell, 3887 - 44th Avenue N.E., Seattle, Washington 98105, USA**

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Humant erythropoietin-gen, fremgangsmåde til ekspression deraf i transficerede cellelinier, de transficerede cellelinier samt det fremstillede humane erythropoietin**

(56) Fremdragne publikationer:
**WO A 8502610**
**DK A 4883/86**
**WO A 8603520**
**PL § 2.2.3**

(57) Sammendrag:

Apa I-restriktionsfragmenter af et humant erythropoietin-gen til produktion af høje titer af biologisk aktive erythropoietinhormoner fra stabilt transficerede cellelinier, tilvejebringes.

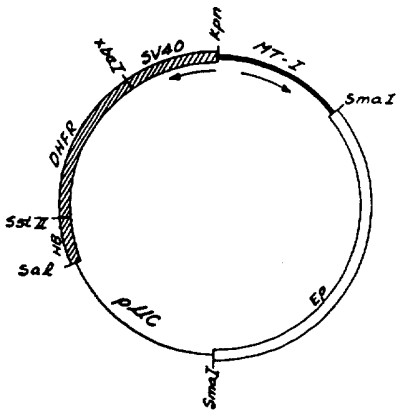


fig. 3.

Den foreliggende opfindelse angår ekspression i høje niveauer af biologisk aktivt humant erythropoietin fra stabilt transficerede celler. Særligt angår opfindelsen et i alt væsentligt rent, rekombinant DNA eller RNA bestående af en nukleotidsekvens svarende til Apa I-restriktionsfragmentet på 2426 bp af et humant erythropoietingen samt en cellelinie omfattende det pågældende DNA eller RNA ifølge opfindelsen operativt bundet til en anden nukleotidsekvens, der er i stand til at fremkalde ekspression deraf.

Opfindelsen angår desuden en fremgangsmåde til ekspression af rekombinant, biologisk aktivt humant erythropoietin omfattende de trin, at man transficerer en værtscellelinie med DNA, RNA eller en nukleotidsekvens bestående af Apa I-restriktionsfragmentet af et humant erythropoietingen, operativt bundet til en anden nukleinsyresekvens, der er i stand til at fremkalde ekspression deraf, bringer de transficerede celler i kontakt med et dyrkningsmedium og ved ekspression lader cellerne producere erythropoietin, og udvinder det producerede erythropoietin.

Opfindelsen angår yderligere en fremgangsmåde til ekspression af rekombinant, biologisk aktivt humant erythropoietin fra en cellelinie, der er i kontakt med et inkubationsmedium, omfattende de trin, at man inkorporerer en cellelinie, der er i stand til at give et udbytte af erythropoietin i inkubationsmediet, hvilken cellelinie er produceret ved transficering af en værtscellelinie med DNA, RNA eller nukleotidsekvenser bestående af Apa I-restriktionsfragmentet af et humant erythropoietingen, operativt bundet til en anden nukleinsyresekvens, der er i stand til at fremkalde ekspression deraf.

Endvidere angår opfindelsen hidtil ukendt humant erythropoietin, som er produceret ved ekspression i en cellelinie ifølge opfindelsen eller ved en fremgangsmåde ifølge opfindelsen.

Det har overraskende og uventet vist sig, at biologisk aktivt humant erythropoietin ifølge den foreliggende opfindelse har en højere specifik aktivitet samt en række andre egenskaber, der væsentligt adskiller erythropoietin ifølge den foreliggende opfindelse fra erythropoietin ifølge den kendte teknik. Erythropoietin ifølge den foreliggende opfindelse har en ændret glykosyleringsprofil i forhold til erythropoietin ifølge den kendte teknik. Den ændrede glykosyleringsprofil opstår sandsynligvis som følge af en sekventiel foldning in vivo af erythropoietin ifølge opfindelsen, som er forskellig fra den opfoldning, der karakteriserer erythropoietin ifølge den kendte teknik. Den ændrede opfoldning af erythropoietin ifølge opfindelsen bevirker, at dette

erythropoietin foreligger i flere forskellige isoformer, typisk fra fire til syv, hvilke isoformer reflekterer både forskellige grader af glycosylering og typen af den pågældende form for glykosylering, særligt sialinering af tilgængelige steder i erythropoietinet.

Erythropoietin ifølge den foreliggende opfindelse har et O-forbundet oligosaccharidindhold, som er væsentligt mindre end ét mol per mol erythropoietin, samt en specifik biologisk aktivitet, som er væsentligt højere en den specifikke biologiske aktivitet, som kendetegner erythropoietin ifølge den kendte teknik, som er beskrevet i WO 85/02610 og WO 86/03520.

Hormonet erythropoietin spiller en vigtig rolle ved regulering af erythropoiesis, dannelsen af røde blodlegemer, og mangel på erythropoietin resulterer i anæmi. Detaljerede undersøgelser af hormonet og forsøg på erstatningsterapi har været vanskelige på grund af knapheden på renset materiale.

Normal produktion af humane røde blodlegemer kræver sekretion af erythropoietin fra nyrerne, tilsyneladende som udviklet glycoprotein. Under ligevægt cirkulerer dette hormon i blodet i en koncentration på 10-18 millienheder (128-230 picog) pr. ml, og ved stimulering i form af alvorlig vævshypoxia (oxygenmangel) kan niveauet stige så meget som 1000 gange. Det forøgede hormonniveau udløser proliferation og differentiering af en population af receptive stammeceller i knoglemarven, stimulerer hæmoglubinsyntese i under udvikling værende erythroidceller, og fremskynder frigivelse af røde blodlegemer fra marven til kredsløbet, hvorved mængden af røde blodlegemer forøges og de hypotoksiske tilstande forbedres. Patienter med mangel på erythropoietin, f.eks. patienter med kronisk nyresvigt, lider ofte af alvorlig anæmi.

Eryhtropoietin er et 34-38 kd glycoprotein, hvor ca. 40% af dets molekylvægt udgøres af carbonhydrat.Der kræves mindst én disulfidbro af mængden til aktiviteten. Der kendes kun lidt til strukturen af dette hormon og detaljerne ved syntesen deraf er ikke helt forstået. Nylig isolering af cDNA og genome kloner giver mulighed for at analysere kontrollen med erythropoietinproduktion, men ekspression af biologisk aktivt humant erythropoietin i tilstrækkelige mængder til erstatningsterapi er endnu ikke blevet opnået.

I overensstemmelse med den foreliggende opfindelse kan biologisk aktivt humant erythropoietin ved ekspression produceres i høje koncen-

trationer (med nominelle titere, der overstiger 2 millioner enheder pr. liter supernatant) ud fra stabilt transficerede cellelinier fra pattedyr. Således tilvejebringes en rig kilde for renset humant erythropoietin til kliniske anvendelser. Overraskende høj ekspression af erythropoietin opnås ved transfektion af værtscellelinier med et Apa I-restriktionsfragment af det humane erythropoietingen. Sense-strengen af Apa I-restriktionsfragmentet har en nukleotidsekvens svarende til den, der er vist i figur 1.

Figur 1 er en skematisk angivelse af det her omhandlede 2426 bp Apa I-restriktionsfragment, der indeholder de humane erythropoietingen-sekvenser,

figur 2 afbilder en repræsentativ plasmidekspressionsvektor (pD11-Ep), der indeholder 2426 bp Apa I-restriktionsfragmentet, og

figur 3 afbilder en anden ekspressionsvektor (pBD-EP), der bærer omhandlede Apa I-restriktionsfragment.

I en foretrukket udførelsesform indsættes et genetisk manipuleret Apa I-restriktionsfragment som vist i figur 1, i en ekspressionsvektor fra et pattedyr, såsom de vektorer, der er vist i figur 2 og 3, og indføres i cellelinier fra pattedyr til udvikling af stabilt transficerede celler, der producerer store mængder biologisk aktivt humant erythropoietin. Apa I-restriktionsfragmentet af det humane erythropoietingen udvælges således, at der opnås den bedst mulige transskription af erythropoietin budbringer-RNA og bedst mulige translation og post-translationel modifikation af RNA til udviklet biologisk aktivt erythropoietin-glycoprotein. Især i 5'-delen af erythropoietingenet var det vigtigt at fjerne interfererende sekvenser, men bibeholde forstærkende sekvenser. Introner bibeholdtes i Apa I-restriktionsfragmentet for at inkludere potentielt signifikant forstærkende sekvenser. I 3'-delen af genet bibeholdes nogle ikke-translaterede 3'-sekvenser for at opnå de formodede optimalt regulerende sekvenser. Den forøgede ekspression, der tilvejebringes af Apa I-fragmentet demonstreres ved de vedvarende høje niveauer for erythropoietinekspression, der er beskrevet i de følgende udførelseseksempler under anvendelse af dette fragment sammen med to promotorer og to cellelinier.

De følgende eksempler tjener til belysning af den foreliggende opfindelse.

Eksempel 1

Isolering af genome kloner

Et humant genom-bibliotek i bakteriofag (Cell 15, 1157-1174, 1978) screenedes under anvendelse af lavstringente hybridiseringsbetingelser og blandinger af oligonukleotidprober som beskrevet i Cell 38, 287-297, (1984), hvortil der henvises i det foreliggende.

Oligonukleotide blandinger fremstilledes under anvendelse af et "Applied Biosystems"-syntetiseringsapparat og mærkedes i enden under anvendelse af $^{32}$p-ATP og T4-nukleotid-kinase. De syntetiske oligonukleotider udformedes således, at de svarede til dele af den N-terminale aminosyresekvens:

$H_2$N-Ala-Pro-?-Arg-Leu-Ile-Leu-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-?-Ile-Thr-Asp-Gly-Gly-Ala

24

tilvejebragt af Yanagawa er al., J. Biol. Chem. 259, 2707-2710, 1984, fra humant protein oprenset fra urin fra patienter med aplastisk anæmi. For at mindske degenerationen af kodonerne for aminosyresekvensen i dette område anvendtes kodonanvendelsesreglerne ifølge Grantham et al., Nucleic Acids Research 8, 43-59, 1981, og Jaye et al., Nucleic Acids Research 11, 2325-2335, 1983. Disse regler tager hensyn til den relativt sjældne forekomst af CpG-dinukleotider i DNA fra hvirveldyr, og undgår, hvor det hensigtsmæssigt, potentielle fejltilpassede A:G pardannelser. I aminosyrestilling 24 anbragtes asparagin som det mest sandsynlige, J. Biol. Chem. 259, 2707-2710, 1984. For aminosyrerne Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn, syntetiseredes 2 puljer med hver 72 sekvenser svarende til de forudsete kodoner. Én pulje var således TT(c/t)TC(a/g/t)GC(c/t)TC(c/t)TT(a/g/t)-GCTTC med hensyn til 20-nukleotid-proban, og i den anden pulje erstattedes T med C i stilling 18. For aminosyrerne Glu-Asn-Ile-Thr-Asp-Gly konstrueredes én pulje af sekvenser (AGC TCC TCC ATC AGT ATT ATT T[c/t]) til en 23-nukleotid-probe.

Plaque'r, der hybridiserede med de oligonukleotide prober rescreenedes ved lavere tæthed, indtil de var rene. Efter plaquerensning af indledningsvist positive fagkloner, offentliggjordes yderligere sekvensinformation vedrørende erythropoietingenet i artiklen af Jacobs et al., Nature 313, 806-310, 1985. Oligonukleotider konstrueredes ud fra denne

information og anvendtes til bekræftelse af identiteten af de positive kloner. Efter Eco RI-restriktionsenzymnedbrydning af de positive kloner, gelrensedes indføjelses-DNA og ligeredes ved hjælp af standardteknik i pUC 13-plasmid, der forud var blevet restriktions-nedbrudt med Eco RI. DNA-sekvensen bestemtes ved dideoxynukleotidkæde-forminering (Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 74, 5463-5467, 1977) under anvendelse af dATP ($\alpha^{35}S$) og den 17-mer universelle primer eller, i udvalgte områder, specifikke oligonukleotide primere. $^{32}$p-ATP stammede fra ICN og enzymerne stammede fra New England Biolabs eller Bethesda Research Laboratories.

Ca. 4,8 x $10^6$ bakteriofag'er screenedes ved hybridisering på nitrocellulose-replikatfiltre. 3 forskellige kloner forblev positive under plaquerensningen, og DNA-indføjelsen karakteriseredes ved restriktionskortlægning og delvis dideoxynukleotid-sekvensering. To af de tre kloner indeholdt tilsyneladende komplet information for erythropoietingenet. Restriktionskortet og sekvensen for 2426 bp Apa I-fragmentet af disse kloner er vist i figur 1, og er praktisk taget det samme, som det nyligt offentliggjortes i artiklen af Jacobs et al., Nature 313, 806-810, 1985) for genet for humant erythropoietin. Den ringe forekomst af fagisolater indeholdende erythropoietingenet i dette udvidede bibliotek, én ud af ca. 2 x $10^6$ bakteriofag'er, er i overensstemmelse med den antagelse, at erythropoietin eksisterer som en enkelt kopi af det humane genom. Southern-blothybridisering af det totale humane DNA-genom med Apa I-fragmentet eller andre restriktionsfragmenter af erythropoietingenet antyder kun et enkelt hybridiseringsbånd uden yderligere regioner med stærkt homologt DNA.

Eksempel 2

Udvælgelse af Apa I-restriktionsfragmentet

Til konstruktion af ekspressionsvektorer tilvejebragtes Apa I-restriktionsfragmentet af erythropoietingenet under anvendelse af teknikken beskrevet i Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467, 1967,hvortil der henvises i det foreliggende. I korthed blev isoleret fag-DNA nedbrudt med restriktionsenzymet Apa I (Bethesda Research Laboratories) efterfulgt af separation på en 1% agarosegel og isolering ved elektroeluering, phenolekstraktion og ethanoludfældning. Fragmentet bekræftedes ved delvis sekvensering som i eksempel 1.

Under henvisning til figur 1 indeholdt det indføjede Apa I-re-

striktionsfragment 58 bp af ikke-translaterede 5'-sekvenser (nukleotider 0001-0058) efterfulgt af sekvenser, der koder for et putativt 27-aminosyre-signal-peptid, det udviklede protein, fire putativt mellemliggende sekvenser, og 222 bp af en ikke-kodende 3'-DNA-sekvens. I 5'-delen af genet findes Apa I-stedet anbragt 58 basepar opstrøms fra ATG-startskodonen (0058) for proteinsekvensen. Denne 5'-plads (0001) udvalgtes for at undgå en falsk startplads umiddelbart opstrøms fra Apa I-restriktionsstedet, medens inkludering af putativt regulerende sekvenser blev anset for at være vigtig af hensyn til effektiv ribosomal binding og bearbejdelse. Apa I-stedet i 3'-enden (2426) udvalgtes for at inkludere putative bearbejdelsessignaler i de fleste af de ikke-translaterede 3'-sekvenser, medens yderligere nedenstrøms sekvenser fjernedes. Det fuldstændige erythropoietingen, herunder intronsekvenser, anvendtes for at inkludere potentielt regulerende eller forstærkende sekvenser i introner, som kan medvirke til erythropoietingenekspression eller proteinmodifikation og -sekretion.

Eksempel 3

Konstruktion af ekspressionsplasmider indeholdende Apa I-restriktionsfragment

2426 bp Apa I-restriktionsfragmentet indeholdende det intakte humane erythropoietingen indføjedes i 2 ekspressionsvektorer, pD-11 og pBD-opbygningerne, som hver især er baseret på en individuel mammalpromotor.

Plasmid-ekspressionsvektoren pD-11 stammede fra et tidligere beskrevet plasmid (Nucleic Acids Research 13, 841-857, 1985, hvortil der specielt henvises i det foreliggende, og indeholdt de forstærkende sekvenser og replikationsoprindelsen fra Simian-virus 40 (SV-40) samt den sene adenovirus-2 -hovedpromotor og tredelte ledersekvenser. Apa I-fragmentet af humane erythropoietingenome-sekvenser (figur 1) gelrensedes og enkelt-strengende ender udfyldtes ved behandling med T4 DNA polymerase. Bam HI linkere ligeredes til begge stumpe ender og opbygningen indføjedes på en unik B-Bam HI-restriktionsplads i pD-11 for at lede transskription af erythropoietingenet fra en stærk promotor.

Strukturen af det resulterende ekspressionsplasmid pD-11-Ep, der indeholder Apa I-fragmentet (Ep), er afbildet i figur 2. Plasmid pD-11 indeholder 350 bp af den terminale venstre del (0-1) af adenovirus, op-

rindelses- og forstærkelsessekvenser fra SV-40 (E), den sene hovedpromotor fra adenovirus (MLP), den tredelte ledesekvens på adenovirus-2 (L1-3) og 5'-splejsningsstedet for den tredie ledesekvens (5'ss), et immunoglubin-3'-splejsningssted (3'ss) og det sene SV-40-polyadenyleringssignal (pA) på Eco RI (RI) restriktionspladsen i pML. Rekombinantplasmider klonedes i E coli HB 101 og rensedes ved isopyknisk centrifugering i cæsiumchlorid. Ekspressionsplasmidet pD-11-EP har en længde på ca. 6500 bp. Opbygningen bekræftedes ved restriktionskortlægning og delvis dideoxynukleotid-sekvensering.

pBD indeholder MT-I-promotorsekvensen (Glanville, Durham & Palmiter, Nature 292, 267-269, 1981, hvortil der specielt henvises til i det foreliggende) og en selekterbar DHFR-markørsekvens båret i pUC-plasmid. Under henvisning til figur 3 indføjedes 2426 bp Apa I-restriktionsfragmentet (EP) på en unik Sma I-restriktionsplads i pBD til fremstilling af ekspressionsplasmid pBD-EP. DHFR-sekvensen i pBD-EP var associeret med oprindelses- og forstærkelsessekvenser fra SV 40 og med Hepatitis B-overfladeantigen-polyadenyleringssekvenser. pBD-EP tilvejebragtes i det væsentlige som beskrevet ovenfor for pD-11-EP.

Medens plasmidvektorer anvendtes ved disse bekræftende eksperimenter tilsigtedes det, at virale eller retrovirale ekspressionsvektorer ligeledes kan anvendes til at indføre Apa I-erythropoietingenfragmentet i værtscellelinier. Passende DNA-virus til dette formål omfatter adenovirus eller BPV (kvæg-papilloma-virus). Passende retrovirale vektorer er også kendte og tilgængelige. Det er åbenbart, at en sådan retroviral (RNA) vektor vil bære anti-sense-strengen af Apa I-restriktionsfragmentet, dvs. én streng med en sekvens svarende til RNA transskriberet fra sense-strengen vist i figur 1 eller til en allel deraf. Den retrovirale vektor vil også omfatte sekvenser for trans-virkende faktorer, der er nødvendige for revers transskription af det virale genom og integration af DNA formen af pågældende virus i værtsgenomet.

Eksempel 4

Transficering af mammalceller

Hver af to mammalcellelinier transficeredes med hver af pD-11-EP- og pBD-EP-opbygningerne. Mammalcellelinier, COS-7 (abenyrer) og BHK (nyrer fra babyhamster) opbevaredes i Dulbecco's modificerede essentielle medium indeholdende 10% føtalt kalveserum. Cellerne overførtes og trans-

ficeredes ved hjælp af calciumphosphatmetoden (Virology 52:456-467, 1973) ved en sammenflydningsgrad på 50-70%. BHK stammer fra nyreepitelceller, der almindeligvis antages at være den mest sandsynlige celle som producerer erythropoietin i naturlig tilstand, hvis et pattedyr er anæmisk eller hypoksisk. Disse celler kan således genkende kritiske regulerende sekvenser i Apa I-fragmentet fra erythropoietingenet, og derefter virksomt oparbejde og fremstille erythropoietin-glycoproteinet.

Til transient ekspression af celler i en 100 mm dyrkningsskål anvendtes ialt 20 µg DNA: 10 µg pD-11 EP-plasmid indeholdende erythropoietingenet og 10 µg laksesperma-bærer-DNA. Efter 48 timer opsamledes supernatanten, centrifugeredes ved 400 G i 10 minutter til fjernelse af celler og rester, og blev nedfrosset ved -20°C. Cellerne høstedes separat. Resultaterne af transficeringer med pD-11-EP alene med hensyn til transient ekspression er vist i tabel I. Data stammer fra 3 forsøg for hver celletype.

Tabel I

| | Erythropoietin pr. ml kultur | |
|---|---|---|
| Mammalceller | Protein µg | Enheder (in vitro bioforsøg) |
| BHK | 3,4 ± 0,2 | 270 ± 16 |
| COS-7 | 3,2 ± 0,4 | 255 ± 32 |

De iagttagede niveauer af erythropoietin udskilt i supernatanten fra enten COS-7 eller BHK mammalcellelinierne var ca. 80 gange højere end de niveauer, der tidligere er noteret for transient ekspression af cDNA, der koder for erythropoietin eller for transient ekspression af andre opbygninger under anvendelse af intakte erythropoietingener.

Til etablering af stabile cellelinier, der producerer høje niveauer af erythropoietin, co-transficeredes enten COS-7- eller BHK-celler med pD-11-EP-plasmidet og pDHFR-1a, et plasmid indeholdende et cDNA for dehydrofolat-reduktase i en lignende mammalekspressionsvektor. Transfektionsmetoden modificeredes således, at 5µg af pD11-EP-plasmidet, 5 µg af pDHFR-1a-plasmidet og 10 µg bærer-DNA cotransficeredes. Efter yderligere inkubation i 18-24 timer sattes forskellige koncentrationer af metho-

trexat (10 nM til 1 mM) til kulturerne. Celler, der inkorporerede DHFR-genet, var levedygtige i det selektive medium. Efter inkubation i flere dage isoleredes levedygtige kolonier, der var resistente overfor methotrexat, overførtes og screenedes for tilstedeværelsen af erythropoietin-bioaktivitet i supernatanten. Omtrent halvdelen af de methotrexat-resistente kolonier, der undersøgtes, udskilte påviselig erythropoietin-aktivitet.

For at etablere stabile cellelinier med ekspressionsvektor pBD-Ep transficeredes BHK-celler ved hjælp af calciumphosphatmetoden. Efter 18-24 timer udsattes disse kulturer for koncentrationer af methotrexat varierende fra 1 μM til 1 mM. Efter inkubation i flere dage, isoleredes levedygtige kolonier, der var resistente overfor disse relativt høje niveauer af methotrexat, overførtes og screenedes. Ved denne undersøgelse udviste alle de methotrexat-resistente kolonier, der undersøgtes, påviselig erythropoietin-aktivitet.

For at optimere ekspressionen af den transkriptionelle enhed indeholdende erythropoietingenet og DHFR-genet overførtes BHK-cellelinier indeholdende enten pBD-Ep eller pD11-Ep og udskillende høje niveauer af erythropoietin flere gange til stigende koncentrationer af methotrexat (Nature 316, 271-273, 1985). I stedet for en gradvis stigning i det selektive tryk på cellelinierne ved langsom trinvis forøgelse af koncentrationen af methotrexat, udsattes cellerne imidlertid omgående for meget høje koncentrationer af methotrexat (dvs. 1 mM). Kun få celler overlevede, men disse celler ville have inkorporeret plasmidopbygningen i et DNA-område, der var særligt fordelagtigt til ekspression (et såkaldt "hot-spot") og/eller ville indeholde mange kopier af den opbyggede transskriptionelle enhed. De stærkest producerende cellelinier udvalgtes således i ét trin. Cellelinier (herunder F 7,2 og S 5,2 anført i tabel II) betragtedes som stabile, hvis erythropoietinproduktionen forblev høj ved mere end 15 overførsler i fravær af selektivt methotrexattryk.

Erythropoietinaktivitetsmængden i cellepellets kunne ikke bestemmes på grund af nærvær af signifikante inhibitorer mod undersøgelsen i celleekstrakterne. Følgeligt omfatter de resultater, der fremgår af tabel II ikke analyseværdier for de intracellulære niveauer af erythropoietinprotein, men i stedet mængden af erythropoietinprotein dannet og udskilt af cellelinierne i supernatanten.

Tabel II

Ekspression af rekombinant erythropoietin fra stabilt transficerede BHK-cellelinier

| Cellelinie | Erythropoietin pr. ml supernatant: Protein µg | Enheder (in vitro bioforsøg) |
|---|---|---|
| pBD-EP | | |
| F 1,1 | 12,4 | 970 |
| F 3,4 | 32,0 | 2500 |
| F 6,1 | 79,6 | 6210 |
| F 7,2 | 84,1 | 6728 |
| pD11-EP | | |
| S 1,2 | 6,4 | 500 |
| S 2,4 | 64,2 | 5000 |
| S 5,2 | 82,1 | 6400 |

De iagttagede mængder erythopoietinudskillelse svarer til en nominel mængde på op til næsten 7 mill. enheder pr. liter. Sådanne nominelle mængder bestemtes ved multiplicering af det iagttagede udbytte pr. ml med 1000 til opnåelse af et forventet produktionsudbytte pr. liter.

De iagttagede mængder erythropoietinudskillelse under anvendelse af Apa I-fragment var af størrelsesordenen 300 gange større end de mængder, der tidligere er angivet, Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7580-7584, nov. 1985, for en stabilt transformeret CHO-cellelinie indeholdende et andet genomfragment af det humane erythropoietingen.

Kontrolforsøg i forbindelse med disse transfektionsforsøg omfattede supernatanter fra ikke-transficerede celler og parallelle kulturer af celler transficeret med plasmider indeholdende DNA, der koder for andre proteiner, herunder bakteriel chloramphenicol-acetyl-transferase og humant koagulationssprotein, faktor IX. Ingen af kontrolkulturerne, defingerede transfektioner, eller dyrkede celler transficeret med andre gener, havde påviselig erythropoietinaktivitet. Under ovennævnte række forsøg med erythropoietingenet blev der også bemærket, at de niveauer af ekspression, der opnåedes for udvalgte cellelinier, ikke havde relation til, om den selektive markør cotransficeredes sammen med erythropoietin-

genet eller indføjedes i det Apa I-fragmentholdige plasmid, forud for transfektion (data ikke vist).

Andre repræsentative transfektionsmetoder, der er egnede til udøvelse af den foreliggende opfindelse, omfatter DEAE-dextran-medierede transfektionsmetoder, lysozymfusion eller erythrocytfusion, skrabning, direkte optagelse, osmose- eller sakkarose-chok, direkte mikroinjektion, indirekte mikroinjektion, såsom via erythrocyt-medierede metoder og/eller underkastelse af værtscellerne for elektrisk strøm. Ved transfektion menes overførsel af genetisk information, og især information, der indkodes af Apa I-restriktionsfragmentet af et humant erythropoietingen, til en celle under anvendelse af isoleret DNA, RNA eller en syntetisk nukleotidpolymer. Ovennævnte liste over transfektionsmetoder skal ikke betragtes som fuldstændig, idet andre metoder til indførelse af genetisk information i celler uden tvivl vil blive udviklet. Apa I-restriktionsfragmentet vil typisk være operativt bundet til (ligeret med) andre nukleinsyresekvenser, såsom promotorsekvenser, forstærkningssekvenser og polyadenyleringssekvenser, forud for transfektion. Skønt værtscellelinier af mammal oprindelse er beskrevet, og nyre-epitelceller betragtes som særligt foretrukne, er det åbenbart at andre eukaryotiske og prokaryotiske (bakterie eller gær) værtscellelinier kan anvendes ved udøvelsen af den foreliggende opfindelse. Nylige forsøg på indførelse mammale gener i planteceller giver også mulighed for anvendelse af plante- eller algeceller.

Eksempel 5

Erythropoietinekspression fra transficerede cellelinier

Det rekombinante erythropoietinprotein, der udskiltes i supernatanten af de transficerede cellelinier, var biologisk aktivt, og store mængder af hormonet udskiltes: op til 7000 enheder pr. ml.

In vitro-afprøvningen af den biologisk aktivitet af erythropoietin var baseret på dannelsen af erytroide kolonier (fra CFU-E, erythroid-kolonidannede celler) i kulturer af knoglemarvceller fra mus i en plasmamasse (Blood Cells 4, 89-103, 1978). Sensitiviteten ved dette forsøg var ca. 5 millienheder/ml. Det erythropoietin, der anvendtes som standard ved afprøvningen, var et delvist renset præparat stammende fra plasma fra anæmiske får (Connaught, trin 3 Ep, Lot 3026). Supernatanter fra overførte cellelinier dyrket i 24 timer i frisk medium uden methotrexat

afprøvedes. Supernatanten fortyndedes 1:200 med medium, og der tilsattes mængder på mellem 1 og 10 µliter pr. ml forsøgskultur indeholdende 2 x $10^5$ marvceller, 10% citratholdigt kvægplasma, 20% føtalt kalveserum, 1% kvægserumalbumin og 1,6% okseembryoekstrakt fra (Gibco). Efter inkubation i 36-48 timer anbragtes plasmamasserne på mikroskoppræparatglas, farvedes med benzidin til hæmoglobinpåvisning, og erythroidkolonierne optaltes. I fravær af tilsat erythropoietin, påvistes ingen CFU-E-afledte kolonier. Optimal erythroid-kolonivækst (100-150 CFU-E påvist pr. 2 x $10^4$ marvceller) iagttoges rutinemæssigt med 50 mU (0,64 nanog) erythropoietin pr. ml kultur. Store mængder erythropoietinhormononer udskiltes i supernatanten af transficerede cellelinier, se tabel I og II, op til 7000 enheder pr. ml. Under antagelse af at rekombinanterythropoietinet havde en specifik aktivitet ækvivalent med aktiviteten af naturligt erythropoietin (78000 enheder pr. mg protein), svarede det biologiske afprøvningsresultat til ca. 80 µg erythropoietinprotein pr. ml.

Derudover Afprøvedes supernatanter fra udvalgte cellelinier for immunologisk reaktivt erythropoietin ved konkurrerende radioimmunoafprøvning under anvendelse af et polyvalent anti-human-erythropoietin kanin-anti-serum (J. Cell. Physiol. 118, 87-96, 1984). Mængden af protein målt ved radioimmunoprøven var ækvivalent med det ved den biologiske afprøvning anslåede proteinniveau. Disse data indikerer at de transficerede cellelinier ved ekspression producerede og udskilte erythropoietinprotein, der var mere end 98% aktivt.

Rekombinanterythropoietin produceret af de transficerede celler karakteriseredes yderligere for at påvise, at disse celler udskilte autentisk hormon. Udvalgte cellelinier afprøvedes for in vivo erythropoietinaktivitet i ekshypoksisk polycythemiske mus (Nature 191, 1069-1087, 1961). Supernatanter udskilt fra cellelinierne besad kraftig in vivo biologisk aktivitet ved afprøvning i de ekshypoksisk polycythemiske mus. Ved forsøg, hvorved anvendtes delvist renset naturligt erythropoietin, var det tidligere konstateret, at neuraminidase-behandling fuldstændigt ophævede erythropoietinaktivitet ved afprøvning i det intakte dyr (J. Biol. Chem. 247, 5159-5160, 1958). Tabet af aktivitet skyldtes formodentligt forøget bortfjernelse i leveren af det desialerede hormon, idet neuraminidase-behandlet erythropoietin forblev fuldt aktivt in vitro. Iagttagelsen af kraftig biologisk aktivitet in vivo indikerede at de transficerede mammale cellelinier på passende måde tilføjer carbohy-

drat og terminale sialsyrer til erythropoietinproteinet under post-translationel modifikation.

Ved separate forsøg neutraliseredes aktiviteten af erythropoietin ved den biologiske afprøvning in vitro af et neutraliserende anti-human erythropoietin-antistof, der sattes til kulturen.

Det erythropoietin, der udskiltes i supernatanten af repræsentative, transficerede cellelinier afprøvedes også for proliferative virkninger på andre marvstamceller. Rekombinant- erythropoietin afprøvedes for dets virkning på forskellige stamceller fra marv fra mus og mennesker, herunder erythroid-kolonidannende celler (CFU-E), erythroid "burst"-dannede celler (BFU-E), granulocyt-makrofage forstadier (CFU-GM) og kolonidannende celler med blandede celler (CFU-Mix) (J. Cell. Physiol. Suppl. 1, 79-85, 1982, J. Cell. Physiol. 118, 87-96, 1984). Erythroide stammeceller udviste et proliferationsrespons på rekombinanterythropoietinet, hvilket respons var magen til det dosis-responsforhold, der fremkom med naturligt erythropoietin. Hverken CFU-GM eller CFU-Mix udviste nogen proliferativ respons på rekombinant- erythropoietinet ved koncentrationer på op til 10 enheder pr. ml forsøgscellekultur.

Ved analyse med SDS-PAGE under reducerende eller ikke-reducerende forhold, opnåedes samme elektroforesebillede med det rensede rekombinanterythropoietin som med erythropoietin oprenset fra urin fra patienter med aplastisk anæmi. Samme mikroheterogenitet for proteinerne iagttoges, og de præ-dominante typer havde identisk molekylvægt på 34 kd.

## PATENTKRAV

1. I alt væsentligt rent, rekombinant DNA eller RNA bestående af en nukleotidsekvens svarende til Apa I-restriktionsfragmentet på 2426 bp af et humant erythropoietingen.

2. DNA eller RNA ifølge krav 1, hvori Apa I-restriktionsfragmentet omfatter nukleotidsekvensen af enten sense-strengen vist i figur 1 eller den komplementære RNA-sekvens deraf.

3. DNA- eller RNA-sekvens ifølge krav 1, som er operativt bundet til en anden nukleinsyresekvens, der er i stand til at fremkalde ekspression deraf.

4. DNA eller RNA ifølge krav 3, hvori den anden nukleinsyresekvens er udvalgt blandt én eller flere af følgende: promotorsekvenser, forstærkende sekvenser, polyadenyleringssekvenser, selekterbare markørsekvenser, plasmider, virale og retrovirale ekspressionsvektorer eller trans-virkende retrovirale faktorer.

5. Cellelinie omfattende DNA eller RNA ifølge krav 3 eller 4.

6. Cellelinie, som er stabilt transficeret med DNA eller RNA ifølge krav 3 eller 4.

7. Cellelinie ifølge krav 5 eller 6, som er udvalgt fra gruppen bestående af eukaryotiske celler.

8. Cellelinie ifølge krav 7, hvori cellerne er mammale celler.

9. Cellelinie ifølge krav 8, hvori cellerne er af renal oprindelse.

10. Cellelinie ifølge krav 9, hvori cellerne er nyreceller

11. Cellelinie ifølge krav 10, hvori cellerne er epitelceller.

12. Cellelinie ifølge krav 11, hvori cellerne er babyhamsternyreceller (BHK-celler).

13. Fremgangsmåde til ekspression af rekombinant, biologisk aktivt humant erythropoietin omfattende de trin, at man transficerer en værtscellelinie med DNA, RNA eller en nukleotidsekvens bestående af Apa I-restriktionsfragmentet på 2426 bp af et humant erythropoietingen, bringer de transficerede celler i kontakt med et dyrkningsmedium og ved ekspression lader cellerne producere erythropoietin, og udvinder det producerede erythropoietin.

14. Fremgangsmåde til ekspression af rekombinant, biologisk aktivt humant erythropoietin fra en cellelinie, der er i kontakt med et inkubationsmedium, omfattende de trin, at man inkorporerer en cellelinie, der er i stand til at give et udbytte af erythropoietin i inkubationsmediet, hvilken cellelinie er produceret ved transficering af en værtscellelinie med DNA, RNA eller nukleotidsekvenser bestående af Apa I-restriktionsfragmentet på 2426 bp af et humant erythropoietingen.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, hvori cellelinien er i stand til at tillade et nominelt udbytte på mindst 2 millioner enheder erythropoietin pr. liter inkubationsmedium.

16. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 13, 14 og 15, hvori Apa I-restriktionsfragmentet findes i et plasmid eller en virus.

17. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 13, 14 og 15, hvori værtscellelinien er udvalgt fra gruppen bestående af eukaryotiske celler.

18. Humant erythropoietin, som er produceret ved ekspression af cellelinien ifølge et hvilket som helst af kravene 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11 og 12.

19. Humant erythropoietin, som er produceret ved fremgangsmåden ifølge et hvilet som helst af kravene 13, 14, 15, 16 og 17.

DNA:epo:apa.
2426

```
          10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
          |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
 +1   CCCGGTGTGG TCACCCGGCG CGCCCCAGGT CGCTGAGGGA CCCCGGCCAG GCGCGGAGAT GGGGGTGCAC GGTGAGTACT CGCGGGCTGG GCGCTCCCGC
+101   CCGCCCGGGT CCCTGTTTGA GCGGGGATTT AGCGCCCCGG CTATTGGCCA GGAGGTGGCT GGGTTCAAGG ACCGGCGACT TGTCAAGGAC CCCGGAAGGG
+201   GGAGGGGGGT GGGGCAGCCT CCACGTGCCA GCGGGGACTT GGGGGAGTCC TTGGGGATGG CAAAAACCTG ACCTGTGAAG GGGACACAGT TTGGGGGTTG
+301   AGGGGAAGAA GGTTTGGGGG GTTCTGCTGT GCCAGTGGAG AGGAAGCTGA TAAGCTGATA ACCTGGGCGC TGGAGCCACC ACTTATCTGC CAGAGGGGAA
+401   GCCTCTGTCA CACCAGGATT GAAGTTTGGC CGGAGAAGTG GATGCTGGTA GCCTGGGGGT GGGGTGTGCA CACGGCAGCA GGATTGAATG AAGGCCAGGG
+501   AGGCAGCACC TGAGTGCTTG CATGGTTGGG GACAGGAAGG ACGAGCTGGG GCAGAGACGT GGGGATGAAG GAAGCTGTCC TTCCACAGCC ACCCTTCTCC
+601   CTCCCCGCCT GACTCTCAGC CTGGCTATCT GTTCTAGAAT GTCCTGCCTG GCTGTGGCTT CTCCTGTCCC TGCTGTCGCT CCCTCTGGGC CTCCCAGTCC
+701   TGGGCGCCCC ACCACGCCTC ATCTGTGACA GCCGAGTCCT GCAGAGGTAC CTCTTGGAGG CCAAGAAGGC CGAGAATATC ACGGTGAGAC CCCTTCCCCA
+801   GCACATTCCA CAGAACTCAC GCTCAGGGCT TCAGGGAACT CCTCCCAGAT CCAGGAACCT GGCACTTGGT TTGGGGTGGA GTTGGGAAGC TAGACACTGC
+901   CCCCCTACAT AAGAATAAGT CTGGTGGCCC CAAACCATAC CTGGAAACTA GGCAAGGAGC AAAGCCAGCA GATCCTACGC CTGTGGCCAG GGCCAGAGCC
+1001  TTCAGGGACC CTTGACTCCC CGGGCTGTGT GCATTTCAGA CGGGCTGTGC TGAACACTGC AGCTTGAATG AGAATATCAC TGTCCCAGAC ACCAAAGTTA
+1101  ATTTCTATGC CTGGAAGAGG ATGGAGGTGA GTTCCTTTTT TTTTTTTTT CCTTTCTTTT GGAGAATCTC ATTTGCGAGC CTGATTTTGG ATGAAAGGGA
```

Fig. 1A.

DK 173067 B1

+1201 GAATGATCGA GGGAAAGGTA AAATGGAGCA GCAGAGATGA GGCTGCCTGG GCGCAGAGGC TCACGTCTAT AATCCCAGGC TGAGATGGCC GAGATGGGAG

+1301 AATTGCTTGA GCCCCGGAGT TTCAGACCAA CCTAGGCAGC ATAGTGAGAT CCCCCATCTC TACAAACATT TAAAAAAATT AGTCAGGTGA AGTGGTGCAT

+1401 GGTGGTAGTC CCAGATATTT GGAAGGCTGA GGCGGGAGGA TCGCTGGAGC CCAGGAATTT GAGGCTGCAG TGAGCTGTGA TCACACCACT GAACTCCAGC

+1501 CTCAGTGACA GAGTGAGGCC CTGTCTCAAA AAAGAAAAGA AAAAAGAAAA ATAATGAGGG CTGTATGGAA TACGTTCATT ATTCATTCAC TCACTCACTC

+1601 ACTCATTCAT TCATTCATTC ATTCAACAAG TCTTATTGCA TACCTTCTGT TTGCTCAGCT TGGTGCTTGG GGCTGCTGAG GGGCAGGAGG GAGAGGGTGA

+1701 CATCCCTCAG CTGACTCCCA GAGTCCACTC CCTGTAGGTC GGGCAGCAGG CCGTAGAAGT CTGGCAGGGC CTGGCCCTGC TGTCGGAAGC TGTCCTGCGG

+1801 GGCCAGGCCC TGTTGGTGAA CTCTTCCCAG CCGTGGGAGC CCCTGCAGCT GCATGTGGAT AAAGCCGTCA GTGGCCTTCG CAGCCTCACC ACTCTGCTTC

+1901 GGGCTCTGGG AGCCCAGGTG AGTAGGAGCG GACACTTCTG CTTGCCCTTT CTGTAAGAAG GGGAGAAGGG TCTTGCTAAG GAGTACAGGA ACTGTCCGTA

+2001 TTCCTTCCCT TTCTGTGGCA CTGCAGCGAC CTCCTGTTTC CTCCTTGGCA GAAGGAAGCC ATCTCCCCTC CAGATGCGGC CTCAGCTGCT CCACTCCGAA

+2101 CAATCACTGC TGACACTTTC CGCAAACTCT TCCGAGTCTA CTCCAATTTC CTCCGGGGAA AGCTGAAGCT GTACACAGGG GAGGCCTGCA GGACAGGGGA

+2201 CAGATGACCA GGTGTGTCCA CCTGGGCATA TCCACCACCT CCCTCACCAA CATTGCTTGT GCCACACCCT CCCCCGCCAC TCCTGAACCC CGTCCAGGGG

+2301 CTCTCAGCTC AGCGCCAGCC TGTCCCATGG ACACTCCAGT GCCACCAATG ACATCTCAGG GGCCAGAGGA ACTGTCCAGA GAGCAACTCT GAGATCTAAG

+2401 GATGTCACAG GGCCAACTTG AGGGCC

*Fig. 1B.*

DK 173067 B1

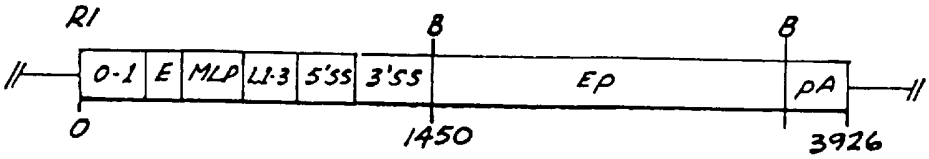
RI
B
B
0-1
E
MLP
L1-3
5'SS
3'SS
EP
pA
0
1450
3926

fig. 2.

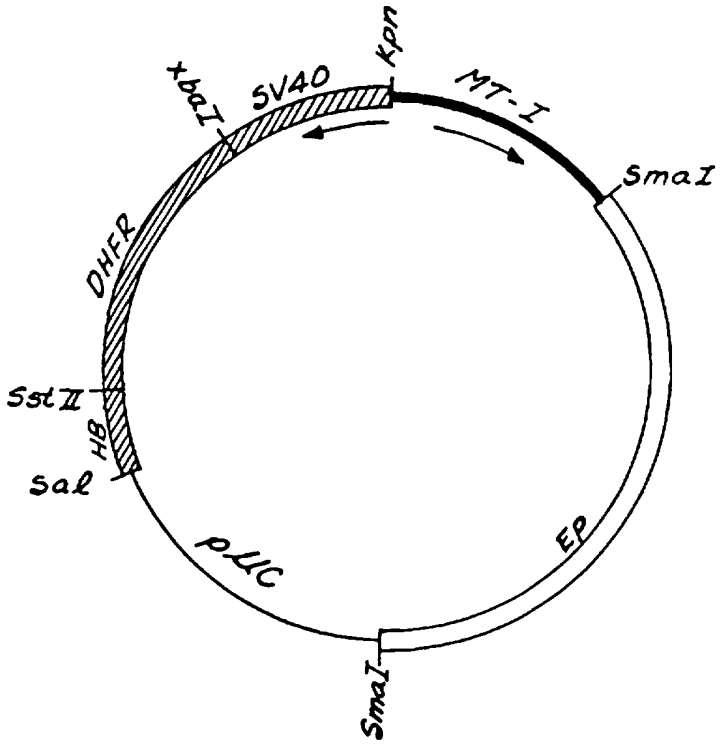
Kpn
MT-I
SmaI
SV40
XbaI
DHFR
SstII
HB
Sal
pUC
EP
SmaI

fig. 3.