



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 36 391 T2 2007.08.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 934 424 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 36 391.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/SE97/00783

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 923 382.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/043436

(86) PCT-Anmeldetag: 13.05.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 20.11.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.08.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 26.07.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 16.08.2007

(51) Int Cl.⁸: C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9601855 14.05.1996 SE
18874 P 29.05.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Biovitrum AB, Stockholm, SE

(72) Erfinder:

ADAMSON, Lars, S-181 33 Lidingö, SE; WALUM,
Erik, S-184 61 Akersberga, SE; DIXELIUS, Johan,
S-753 24 Uppsala, SE; LIMA LIE, Kristina, S-117 65
Stockholm, SE

(74) Vertreter:

WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES REKOMBINANTEN POLYPEPTIDS UNTER HINZUFÜ-
GUNG EINES HEMMSTOFFES EINER METALLABHÄNGIGEN PROTEASE ODER CHYMOTRYPSINS ZUM ZELL-
KULTURMEDIUM

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Proteinen und Polypeptiden und ein Zellkulturmedium zur Verwendung bei dieser Herstellung. Insbesondere betrifft die Erfindung das Kultivieren von Zellen in einem Zellkulturmedium, das einen Inhibitor von metallabhängigen Proteasen enthält.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Proteolytische Enzyme sind an allen Körperfunktionen beteiligt, und die meisten von diesen haben natürliche regulatorische Gegenstücke, d.h. Proteaseinhibitoren. Die Internationale Kommission für Enzyme hat eine systematische Klassifizierung und Nomenklatur für proteolytische Enzyme eingeführt: 1) Serinproteinasen, 2) Cysteinproteininasen, 3) Aspartatproteininasen, 4) Metalloproteininasen, die alle entsprechend einer essentiellen Gruppe in ihrem aktiven Zentrum klassifiziert sind, und schließlich 5) eine Unterkategorie von Proteininasen mit bisher unbekanntem katalytischem Mechanismus (Borivoj Keil, „Specificity of Proteolysis“, Springer-Verlag NY, 1992, 336 Seiten). Die Intention dieser Klassifizierung ist nicht funktional, nach hängt sie mit der biologischen Quelle des in Frage stehenden Enzyms zusammen. Das Problem der Klassifizierung von proteolytischen Enzymen, oft abgekürzt als Proteasen, wird in dem Einleitungskapitel beschrieben: „Die Klassifizierung der Enzyme in der Enzymnomenklatur (1200) wird gemäß den Reaktionen, welche diese katalysieren, durchgeführt. Diese Regel kann kaum für Endopeptidasen angewendet werden. Die Gesamtreaktion, welche durch diese große Gruppe von Enzymen katalysiert wird, ist im Wesentlichen immer dieselbe: die Spaltung einer Peptidbindung. Ein Protein kann jedoch nicht als ein Substrat im klassischen Sinne betrachtet werden: es enthält Hunderte von potentiellen Substraten, eine Gruppe von qualitativ unterschiedlichen Peptidbindungstypen mit variierender quantitativer Vertretung. Darüber hinaus kann die Verfügbarkeit dieser Bindungen entsprechend der Gesamtkonformation der Polypeptidkette variieren. Daher macht die Enzymnomenklatur für Endopeptidasen eine Ausnahme von ihrer Regel: anstatt der Klassifizierung gemäß der katalysierten Reaktion werden Endopeptidasen durch den Typ ihrer aktiven Stelle klassifiziert. Auf diese Weise werden Enzyme mit vollkommen verschiedener Spezifität (wie Trypsin, Chymotrypsin und Prolylpeptidase) in derselben Gruppe gefunden.“ Wie weiterhin in derselben Referenz dargestellt wird, ist die Substrat- und Inhibitorspezifität weitaus komplizierter als ein einfacher Zusammenhang von fünf Klassen von Enzymen. Nichtsdestotrotz wird diese Klassifizierung weithin in der Literatur verwendet, beispielsweise, wenn verschiedene Effekte der Proteolyse beschrieben werden sollen.

[0003] Bei Serinproteasen ist ein Serinanteil für die Aktivität, d.h. die Spaltungsfunktion, wesentlich. Die Spezifität von verschiedenen Serinproteasen basiert auf den Merkmalen der Hohlräume, in welche die Strukturen der entsprechenden Substrate hinein passen. Eine tiefe Spalte ist für die Spezifität von Chymotrypsin für aromatische und andere sperrige hydrophobe Seitenketten verantwortlich (siehe L. Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA, USA, 1981 Seiten 157-166).

[0004] Viele Proteasen benötigen Erdalkalimetalle oder Metalle (im Folgenden nur als Metalle bezeichnet) für ihre Aktivität. Die metallabhängigen Proteasen werden entweder als metallaktivierte Proteasen (zu welchen Metallionen für eine Aktivität zugegeben werden müssen) oder Metalloproteininasen (welche Metalle als einen integralen Teil ihrer Struktur enthalten) angesehen. In Bezug auf die erste Gruppe treten eine Aktivierung und Stabilisierung der Enzyme durch Metalle oft in mehreren Klassen von Proteasen wie z.B. Serin- und Cysteinproteininasen auf.

[0005] Die Bedeutung einer Metalloproteinase in kultivierten Endothelzellen für die Sekretion eines gewissen Metaboliten wurde von R. Ikegawa et al. in Biochem. Biophys. Res. Comm. 171(2), S. 669-675 (1990) gezeigt. Dieses wurde durch die unterdrückende Wirkung auf diese Sekretion aufgezeigt, welche bei der Zugabe des Metalloproteinase-spezifischen Inhibitors Phosphoramidon festgestellt wurde. Es war jedoch offensichtlich, dass das Enzym auf den intrazellulären Raum beschränkt war, da keine Wirkung des Inhibitors in einem zellfreien konditionierten Medium erhalten wurde.

[0006] Die Wirkung von Proteasen wird jedoch weitaus häufiger im Zusammenhang mit dem potentiellen Risiko eines Abbaus des in Frage stehenden Proteins erwähnt.

[0007] Die Wirkung von Proteasen in Kulturen von CHO-Zellen wurde von M. Satoh et al., In Vitro Cell Dev. Biol. 26, 1101-1104 (1990) untersucht. Verschiedene Inhibitoren wurden verwendet, um die vorliegende prote-

olytische Aktivität zu klassifizieren. Es wurde aus dem Fehlen einer Inhibition durch Zugabe von Phosphoramidon geschlossen, dass die Proteasen nicht zu den Metalloproteasen gehören, wenigstens nicht zu denen, von denen allgemein bekannt ist, dass sie durch dieses Mittel inhibiert werden. Die Wirkung von anderen zugegebenen Inhibitoren zeigte, dass die extrazelluläre proteolytische Aktivität durch Cysteinproteasen entstand.

[0008] Eine weitere Untersuchung beschreibt die proteolytischen Profile für BHK-Zellen bzw. Hybridomkulturen (R. B. Kratje et al., J. Biotechnol. 32, 107-125 (1994)). Es wurde bei keinem dieser Zelltypen eine Aktivität von Metalloproteasen gefunden. Es wurde jedoch eine Aktivität identifiziert, die mehreren Serinproteasen entsprach. Es wurde ebenfalls offenbart, dass das Vorliegen von Proteasen nicht nur von dem Typ der verwendeten Zellen sondern ebenfalls von den Kulturbedingungen und dem Alter der Kultur abhing.

[0009] Aus den oben erwähnten Veröffentlichungen ist ersichtlich, dass eine stabile Sekretion von Polypeptiden in Zellkulturen durch eine Vielzahl von proteolytischen Enzymen beeinträchtigt werden kann. Zur effizienten Kontrolle dieser abbauenden Kräfte werden vielseitige Werkzeuge benötigt. Durch eine solche Kontrolle würde die Homogenität des Zielproteins besser beibehalten werden. Darüber hinaus würden Proteinadditive oder Substanzen, die endogen von den Zellen produziert werden, welche für einen proteolytischen Angriff anfällig sind, geschützt werden. Insgesamt würde eine höhere Leistungsfähigkeit und Beständigkeit des Verfahrens als Ganzes erreicht werden.

[0010] Tokunaga et al., Yeast, Bd. 9 (1993), Seiten 379-387 bezieht sich auf eine Chymostatin-empfindliche Proteaseaktivität in dem Zellkulturnedium von *Schizosaccharomyces pombe*, welche α -Amylase verdaut, die in das Kulturnedium sekretiert wird. Tokunaga et al. offenbaren nur α -Amylase der Maus. Weiterhin ist *Schizosaccharomyces pombe* eine Spalthefe, und α -Amylase ist ein Enzym, insbesondere ein Kohlenhydrat-abbauendes Enzym.

[0011] EP-A2-319944 von ZymoGenetics bezieht sich auf eine Coexpression in eukaryotischen Zellen eines gewünschten Proteins, z.B. t-PA, Faktor VII oder Faktor IX, und eines Proteins, welches das gewünschte Protein prozessiert oder stabilisiert, z.B. eines Proteaseinhibitors. In diesem Fall wird daher der Proteaseinhibitor *in situ* erzeugt. Dieses erfordert die Einführung einer ersten DNA-Sequenz, welche das gewünschte Protein codiert, und wenigstens einer zusätzlichen DNA-Sequenz, welche das stabilisierende Protein codiert.

[0012] WO-A-9002175 von Novo-Nordisk offenbart ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden durch Kultivieren von eukaryotischen Zellen in der Gegenwart von verschiedenen Proteaseinhibitoren. Spezifische Beispiele beinhalten Faktor VIII als das Polypeptid, aber die Proteaseinhibitoren sind alle auf Serin- und Cysteinproteasen gerichtet.

[0013] In der EP-A-306 968 von Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst. und Teijin wird Aprotinin in einem Zellkulturnedium verwendet, das zur Herstellung eines Deletionsderivats von Faktor VIII verwendet wird. Es wurde angegeben, dass das Expressionsniveau nach Zugabe von 100 bis 10.000 KIU/ml zwei- bis dreimal höher war als die Kontrolle ohne Zugabe von Aprotinin.

[0014] Die Probleme, die mit metallabhängigen Proteasen bei der Herstellung von verschiedenen Proteinen angetroffen werden, wurden sehr viel weniger überblickt als die Rolle von Cystein- und Serinproteasen, insbesondere in der Literatur, die Säugetierzellkulturen abdeckt. Insbesondere wurde das spezielle Problem mit metallabhängigen Proteasen früher nie in Verbindung mit Faktor VIII angesprochen.

[0015] Verschiedene Lösungen sind vorgeschlagen worden, um den Abbau durch Proteasen von Proteinen und Polypeptiden, z.B. aus dem Plasma stammenden wie auch rekombinanen Faktor VIII-Molekülen, zu verringern. Diese Lösungen waren darauf gerichtet, den Einfluss von Serin- und Cysteinproteasen im Allgemeinen zu verringern. Serin- und Cysteinproteasen werden im Blutplasma wie auch in Zellkulturen als die schädlichsten betrachtet. So offenbart die WO-A-9310143 von Johnson et al. ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten und stabilisierten Proteins durch Inkontaktbringen einer biologischen Probe, die Faktor VIII enthält, mit wenigstens einem Protease-inhibierenden oder Protease-entfernenden Mittel. Das Verfahren ist insbesondere darauf gerichtet, Thrombin zu inhibieren oder zu entfernen, da von Faktor VIII gesagt wird, dass dieser für kleinste Mengen dieser Serinprotease, die natürlicherweise im Blutplasma vorliegt, sehr empfindlich ist. Die Proteaseinhibitoren beinhalten z.B. Benzamidin, Antithrombin III, Heparin und Hirudin. Die Wirkung des Verfahrens wird nur für aus dem Plasma stammenden Faktor VIII gezeigt.

[0016] Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung für die Probleme bereitzustellen, die mit Proteasen im Allgemeinen und insbesondere mit metallabhängigen Proteasen in Zellkulturnmedien, die zur Erzeu-

gung rekombinanter Proteine und Polypeptide, speziell Faktor VIII verwendet werden, angetroffen werden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0017] Proteasen neigen im Allgemeinen dazu, die Aktivität von Proteinen und Polypeptiden durch ein Abbauen des Moleküls zu verringern. Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerungen des schädlichen Einflusses gewisser Proteasen auf rekombinante Protein- und Polypeptidmoleküle durch Zugeben eines Inhibitors für metallabhängige Proteasen zu dem Zellkulturmedium. Das Vorliegen des spezifischen Proteaseinhibitors der vorliegenden Erfindung erlaubt eine verlängerte Ernteperiode und eine beträchtlich höhere Ausbeute bei im Wesentlichen beibehaltener Protein- und Polypeptidaktivität. Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Zellkulturmedium zum Kultivieren von Zellen, welche ein biologisch aktives rekombinantes Polypeptid exprimieren und sekretieren, welches einen Inhibitor für metallabhängige Proteasen enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von rekombinantem Faktor VIII, welcher gemäß dem vorliegenden Verfahren in einem Zellkulturmedium erzeugt wurde, zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten mit den Symptomen von Hämophilie A. Ebenso betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Hämophilie A durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge an rekombinantem Faktor VIII, welcher in einem Zellkulturmedium gemäß dem vorliegenden Verfahren erzeugt wurde.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0018] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, den Einfluss von metallabhängigen Proteasen zu verringern, wenn Wirtszellen zur Erzeugung rekombinanter Proteine kultiviert werden.

[0019] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, effiziente Kultivierungsbedingungen bereit zu stellen, wodurch die Aktivität der rekombinanten Polypeptide im Wesentlichen beibehalten wird.

[0020] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Halbwertszeit der proteinartigen Zusätze, die zu dem Zellkulturmedium zugegeben werden, und anderer Proteine, welche durch die Zellen hergestellt werden und in das Kulturmedium sekretiert werden, zu erhöhen.

[0021] Die obigen Aufgaben werden durch die vorliegende Erfindung gelöst, welche ein Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven rekombinanten humanen Polypeptids in einem Zellkulturmedium betrifft, welches die Expression und Sekretion des Polypeptids erlaubt, wobei ein Inhibitor von metallabhängigen Proteasen zu dem Zellkulturmedium zugegeben wird.

[0022] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Zellkulturmedium zum Kultivieren von Zellen, die ein biologisch aktives rekombinantes humanes Polypeptid exprimieren und sekretieren, wobei das Zellkulturmedium einen Inhibitor von metallabhängigen Proteasen enthält.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum Kultivieren von Zellen, die ein rekombinantes humanes Polypeptid exprimieren, in einem Zellkulturmedium, wobei das Zellkulturmedium einen Inhibitor von metallabhängigen Proteasen enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten humanen Polypeptids durch Kultivieren von Zellen, die das Polypeptid exprimieren, durch Kultivieren von Zellen, die ein rekombinantes humanes Polypeptid exprimieren, in einem Zellkulturmedium, welches einen Inhibitor von metallabhängigen Proteasen enthält, und Gewinnen des Polypeptids.

[0024] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben gefunden, dass gewisse Proteaseinhibitoren einen überraschend positiven Einfluss auf die Aktivität von Polypeptiden während der Kultivierung von Wirtszellen, welche rekombinante Polypeptide exprimieren, haben. Die Gegenwart dieser Inhibitoren führt zu einer höheren Produktivität. Auf diese Weise kann die Ausbeute an Polypeptid mit im Wesentlichen beibehaltener Aktivität und/oder Homogenität beträchtlich erhöht werden.

[0025] Die Inhibitoren von metallabhängigen Proteasen sind geeigneterweise Verbindungen, die einen hydrophoben Anteil enthalten. Geeigneterweise ist der hydrophobe Anteil eine aromatische, heterozyklisch aromatische oder eine andere sperrige Seitengruppe. Heterozyklisch aromatische Seitengruppen beziehen sich auf aromatische Verbindungen, in welchen ein Element, das von Kohlenstoff verschieden ist, in dem aromatischen Ring vorliegt. Beispiele sind Pyridin, Pyrrol, Furan und Thiophen. Weiterhin bezieht sich in der vorliegenden Erfindung der Ausdruck hydrophobe sperrige Seitengruppe auf verschiedene andere nichtpolare Ringstrukturen wie z.B. Monocycloalkane, z.B. Cyclohexan, Dicycloalkane und Polycycloalkane oder substituierte Deriva-

te von irgendeiner dieser Strukturen.

[0026] Die metallabhängigen Proteasen werden entweder als metallaktivierte Proteasen (zu welchen Metallionen zur Aktivität zugegeben werden müssen) oder Metalloproteasen (welche Metalle als einen integralen Teil ihrer Struktur enthalten) angesehen. In Bezug auf die erste Gruppe treten eine Aktivierung und Stabilisierung der Enzyme durch Metalle oft in mehreren Klassen von Proteasen wie z.B. Serin- und Cysteinproteasen auf. Beispielsweise ist auf dem Gebiet der Blutfunktionen, insbesondere Gerinnung, Fibrinolyse und Komplement-Aktivierung, eine Gruppe von Vitamin K-abhängigen Calcium bindenden Domänen häufig (siehe z.B. László Patthy in Methods in Enzymology, 222, Seiten 10-21 (1993)). In Bezug auf die letzteren Metalloproteasen kann man einen Überblick über Metalloendopeptidasen von Säugetieren, welche eine wichtige Untergruppe dieser Proteaseklasse sind, in Bond et al., Int. J. Biochem., 17, Nr. 5, Seiten 565-574 (1985) finden. Diese Autoren folgern, dass Zn^{2+} das essentielle Metall für all die charakterisierten Metalloproteasen von Säugetieren zu sein scheint. In einer neueren Übersicht (D. A. Auld, Methods in Enzymology, 248, Seiten 229-242 (1995)) wird dieses Ion immer noch als das aktive Ion von einer überwältigenden Mehrheit der Metalloproteasen betrachtet. Dieses schließt nicht eine strukturelle und funktionelle Rolle von ebenfalls anderen Metallen wie Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} aus (Auld, siehe oben). So wird ein Enzym, das sowohl von Zn^{2+} als auch von Ca^{2+} abhängig ist, in Butler et al., Biochem. J., 241, Seiten 229-235 (1987) beschrieben.

[0027] In der vorliegenden Erfindung können die Inhibitoren von metallabhängigen Proteasen Verbindungen sein, die strukturell mit dem natürlichen Substrat der Protease verwandt sind und einen elektronegativen Anteil enthalten. Solche Verbindungen sind geeigneterweise Peptide, Peptidanaloge oder andere Verbindungen, die einen Teil des natürlichen Substrats nachahmen, welche vorzugsweise ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Phosphoramidaten, Hydroxamaten und Carboxylaten. Der Mechanismus für die Inhibition der Metalloproteasen durch Peptide oder Peptidanaloge, die z.B. mit Phosphoramidaten, Hydroxamaten oder Carboxylgruppen funktionalisiert sind, ist nicht völlig klar. Jedoch wird ihre Wirkung in der Literatur als auf einer Chelatbildungsfunktion beruhend angesehen (siehe insbesondere Seiten 221-222 von Birkedal-Hansen et al., Critical Review in Oral Biology and Medicine, 4(2), Seiten 197-250 (1993)).

[0028] Strukturell verwandte Verbindungen können natürlich, wie in dem Fall von Phosphoramidon, oder synthetisch sein. Über die Planung solcher synthetischen Inhibitoren geben Bond et al. (siehe oben) einen Überblick. Ein Beispiel, welches von N. Nishino und J. C. Powers in Biochemistry, 17(14), Seiten 2846-2850 (1978) beschrieben wird, ist die Synthese von spezifischen Inhibitoren für die Zink-Metalloendopeptidase Thermolysin. In diesem Fall wurde die Spezifität des Inhibitor-Peptidanalogens erzielt, indem eine hydrophobe Aminosäure, die zur Wechselwirkung mit einer entsprechenden Tasche in der aktiven Stelle des Enzyms gedacht war, wie auch ein Hydroxaminsäurerest zur Wechselwirkung mit dem Zinkatom aufgenommen wurden. Eine Darstellung dieses Phänomens wird in B. Roques et al. in Methods in Enzymology, 248, Seiten 263-283, insbesondere Seiten 268-269 und 272 (1995)) angegeben. Weitere Beispiele von Hydroxamaten werden in der WO 90/05719 offenbart.

[0029] Die Phosphoramidate, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, können natürlich oder synthetisch sein. Phosphoramidon ist ein natürliches Phosphoramidat, das bevorzugt in der vorliegenden Erfindung verwendet wird. Phosphoramidon inhibiert die Wirkung von Thermolysin, einer Metallo-Endopeptidase. Die Struktur dieses Phosphoramidats ist N-(α -L-Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-L-leucyl-L-tryptophan), abgekürzt Rha-P-Leu-Trp.

[0030] Der Rest P-Leucin-Tryptophan, der in Phosphoramidon vorliegt, ist ein häufiges Merkmal für mehrere Phosphoramidate. Daten aus verschiedenen Quellen zeigen, dass dieser Rest die aktive Gruppe, z.B. in Phosphoramidon, ausmacht. Daher werden in der vorliegenden Erfindung geeigneterweise Verbindungen verwendet, welche den Rest P-Leucin-Tryptophan enthalten.

[0031] Die Konzentration des Inhibitors von metallabhängigen Proteasen kann in dem Bereich von ca. 5 nM bis hoch zu ca. 5 mM, geeigneterweise in dem Bereich von 0,5 μ M bis hoch zu 2 mM und vorzugsweise in dem Bereich von 1 μ M bis hoch zu 1 mM liegen.

[0032] Die Wirtszellen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können prokaryotische oder eukaryotische, geeigneterweise eukaryotische Zellen sein. Die Wirtszellen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können Zellen von Säugetieren, Bakterien, Pilzen oder Insekten sein. Die Zellen sind geeigneterweise Säugetierzellen oder Insektenzellen, vorzugsweise Säugetierzellen. Die Insektenzellen können SF-9- oder SF-21-Zellen sein. Die Säugetierzellen können Ovarienzellen des Chinesischen Hamster (CHO), Babyhamster Nieren (BHK)-Zellen, COS-Zellen oder Hybridomzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, sein.

[0033] Das Zellkulturmedium kann Serum enthalten. Geeigneterweise ist das Zellkulturmedium jedoch ein Medium mit wenig Serum und vorzugsweise ein serumfreies Medium. Das Zellkulturmedium kann weiterhin ein oder mehrere zugesetzte Proteine wie z.B. humanes Serumalbumin (HSA), Rinderserumalbumin (BSA), Insulin, Wachstumsfaktoren, IGF-1, IGF-2, Wachstumshormon, Neurotrophine, Leptin, Transferrin und den von Willebrand Faktor (vWF) enthalten. Wenn Proteine in der vorliegenden Erfindung zu dem Zellkulturmedium zugegeben werden, werden solche Proteine vorzugsweise durch rekombinante DNA-Techniken erzeugt. Vorzugsweise ist das Zellkulturmedium ein proteinfreies Medium, d.h. frei von zugesetzten proteinartigen Substanzen. Dieses ermöglicht die Herstellung eines Polypeptids mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität. Auf dieses Weise wird das Medium wohldefiniert sein, und das Risiko der Einführung von Verunreinigungen wie z.B. Mycoplasma, Bakteriophagen, Virus und Toxinen wird fast ausgeschlossen sein. Zusätzlich wird die später folgende Reinigung der erzeugten Polypeptidmoleküle erleichtert werden.

[0034] Das Zellkulturmedium kann auf einem Vollmedium oder einem Basisnährmedium, das durch eine Anzahl von Komponenten ergänzt wird, basieren. Beispiele für geeignete Vollmedien sind verschiedene ASF-Medien, die von Ajinomoto aus Japan vertrieben werden, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), Eagle's Minimum Essential Medium, Ham's Medium F-12 und RPMI-1640-Medium. Verschiedene Kombinationen von DMEM und Ham's F-12, welche beide von GIBCO aus Renfrewshire in Schottland vertrieben werden, sind ebenfalls ein geeignetes Vollmedium zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Ein ergänztes Basismedium kann hergestellt werden, indem die Komponenten gemäß Standardverfahren zur Herstellung von Zellkulturniedien zu dem Basisnährmedium zugegeben werden.

[0035] Zusätze, die zu dem Zellkulturmedium zugegeben werden, sind für die vorliegende Erfindung nicht kritisch und können Kombinationen von jenen sein, die auf dem Gebiet der Technik bekannt sind, welche für die in Frage stehenden Zellen geeignet sind. Beispiele für Zusätze, die verwendet werden können, beinhalten Insulin, Transferrin, Ascorbinsäure, Ethanolamin, Glutamin und Natriumselenit.

[0036] Der Proteaseinhibitor kann zu dem Zellkulturmedium einmal, mehrere Male oder kontinuierlich während des Kultivierungszeitraums zugegeben werden. Die Inhibitoren der vorliegenden Erfindung werden geeigneterweise bei einem Wechsel des Mediums zu dem Zellkulturmedium zugegeben. Die Proteaseinhibitoren können eine Mischung eines Inhibitors von metallabhängigen Proteasen und eines Inhibitors von Chymotrypsinen sein. Der Proteaseinhibitor kann ebenfalls eine Kombination eines Inhibitors von metallabhängigen Proteasen und eines Inhibitors von Chymotrypsinen sein, die in willkürlicher Folge zugegeben werden.

[0037] Bei der vorliegenden Erfindung bezieht sich Polypeptide auf Proteine und Oligopeptide mit wenigstens 20 Aminosäuren in der Kette. Die Anzahl an Aminosäuren des Polypeptids, das gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt wird, liegt geeigneterweise in dem Bereich von 30 bis hoch zu 4.500 Aminosäuren und vorzugsweise in dem Bereich von 40 bis hoch zu 3.000 Aminosäuren. Polypeptide, die gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt werden können, umfassen Polypeptide, die Gerinnungs-, gerinnungshemmende und fibrinolytische Aktivitäten zeigen, membrangebundene und Kern-Rezeptoren und den Metabolismus regulierende humurale Faktoren (Hormone). Spezielle Beispiele von Polypeptiden, die gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt werden können, sind Faktor VIII, Faktor V, Faktor VII, Faktor IX, tPA, Prostaglandin-Rezeptoren, Glucocorticoid-Rezeptoren, Peroxisom Proliferatoren Aktivierte Rezeptoren (PPARs), Faktoren, die das Wachstum und das Überleben der Zelle fördern, Interleukin, Interferon und IGF-bindende Proteine (IGFBP). Die Polypeptide können die volle Länge aufweisen, d.h. die Sequenz der Aminosäuren ist identisch mit der entsprechenden Sequenz, die in Säugetieren im Allgemeinen und in Menschen im Besonderen gefunden wird. Die Polypeptide können ebenfalls Deletionsderivate von den Polypeptiden in voller Länge sein, wobei eine oder mehrere Aminosäuren fehlt/fehlen. In der vorliegenden Erfindung ist das Polypeptid vorzugsweise Faktor VIII.

[0038] In der vorliegenden Erfindung kann der Faktor VIII, der durch rekombinante DNA-Technik hergestellt wird, Faktor VIII in voller Länge oder vorzugsweise ein Deletionsderivat von Faktor VIII in voller Länge, das Gerinnungsaktivität aufweist, sein. Mit Deletionsderivat ist hier Gerinnungsfaktor VIII gemeint, bei welchem die gesamte oder ein Teil der B-Domäne fehlt, während die Gerinnungsaktivität beibehalten wird. Die verbleibenden Domänen sind in geeigneter Weise durch einen Aminosäure-Linker verknüpft. Beispiele für verschiedene Linker-Konstruktionen werden in P. Lind et al., Eur. J. Biochem., Bd. 232 (1995), Seiten 19-27 angegeben. Die Struktur und Biochemie von rekombinanten Faktor VIII-Produkten im Allgemeinen wurden von Kaufman in Trends in Biotechnology, 9, Seiten 353-359 (1991) und Hematology, 63, Seiten 155-65 (1991) beschrieben.

[0039] Faktor VIII in voller Länge, der in menschlichem Plasma vorliegt, weist eine Molekülmasse von ca. 300 kDa auf. Faktor VIII-Konzentrate, die aus solchem Plasma stammen, enthalten mehrere fragmentierte voll ak-

tive Faktor VIII-Formen, wie von Andersson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, Seiten 2979-83 (Mai 1986) beschrieben wird. Die kleinste aktive Form weist eine Molekülmasse von ca. 170 kDa auf und besteht aus zwei Ketten von ca. 90 kDa und ca. 80 kDa, die durch ein Metallionen) zusammengehalten werden. Bezug genommen wird hier auf EP-A-O 197 901 (Pharmacia AB). Der biologisch aktive Faktor VIII, welcher gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt wird, weist daher geeigneterweise eine Molekülmasse in dem Bereich von ca. 170 kDa bis hoch zu ca. 300 kDa auf.

[0040] Pharmacia AB aus Stockholm, Schweden, hat ein rekombinantes Faktor VIII-Produkt entwickelt, welches der Plasma-Faktor VIII-Form mit ca. 170 kDa in therapeutischen Faktor VIII-Konzentraten entspricht. Das trunkierte rekombinante Faktor VIII-Moleköl wird r-VIII SQ genannt und wird durch Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) in einem Zellkulturverfahren in serumfreiem Medium erzeugt. Die Struktur und Biochemie von r-VIII SQ wurden in der WO-A-9109122 (Pharmacia AB) beschrieben. In der vorliegenden Erfindung ist das Deletionsderivat insbesondere der rekombinante Faktor VIII SQ (r-VIII SQ).

[0041] Der rekombinante Faktor VIII, welcher in einem Zellkulturmedium gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt wird, kann zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten mit den Symptomen von Hämophilie A verwendet werden. Ebenso betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung der Hämophilie A durch die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge an rekombinantem Faktor VIII, welcher in einem Zellkulturmedium gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt wurde.

[0042] Der pH des Zellkulturmediums liegt geeigneterweise in dem Bereich von ca. 6 bis hoch zu ca. 8. Die Osmolalität des Zellkulturmediums liegt geeigneterweise in dem Bereich von ca. 280 bis hoch zu ca. 400 Milliosmolen.

[0043] Die Zellkulturtechnik kann eine Suspensionskultur-, Einzelschichtkultur- wie z.B. Rollerflaschen-, Mikroträger- oder Hohlfaser-, vorzugsweise eine Suspensionskulturtechnik sein.

[0044] Der Modus der Durchführung des vorliegenden Verfahrens kann kontinuierlich oder diskontinuierlich sein.

[0045] Die folgenden Beispiele sind nur zu Zwecken der Veranschaulichung angegeben und sollen nicht als in irgendeiner Weise den Umfang der vorliegenden Erfindung, die in den angefügten Ansprüchen definiert ist, beschränkend ausgelegt werden.

[0046] Die Prozentsätze und Teile beziehen sich auf das Gewicht, sofern nichts anderes angegeben ist.

EXPERIMENTELLES

Herstellung von rekombinantem Faktor VIII

[0047] Die Herstellung von rekombinantem Faktor VIII SQ (r-VIII SQ) wurde im Wesentlichen so durchgeführt, wie in dem Patent WO-A-9109122 von Pharmacia & Upjohn, Beispiele 1 bis 3, beschrieben wird. Eine DHFR-defiziente CHO-Zelllinie (DG44) wurde einer Elektroporese mit einem Expressionsvektor, der das r-VIII SQ-Gen enthielt, und einem Expressionsvektor, der das Dihydrofolatreduktasegen enthielt, unterzogen. Nach einer Selektion auf selektiven Medien wurden überlebende Kolonien durch Wachstum in schrittweise ansteigenden Mengen an Methotrexat amplifiziert. Überstand aus den resultierenden Kolonien wurde einzeln auf Faktor VIII-Aktivität hin gescreent. Ein Produktionsklon wurde ausgewählt, und dieser wurde anschließend an ein Wachstum in serumfreier Suspension in einem definierten Medium adaptiert.

Material

[0048] Das Chymostatin, das in den Experimenten verwendet wurde, enthielt Chymostatin A, Chymostatin B und Chymostatin C, wobei Chymostatin A den größten Teil ausmachte. Die Proteaseinhibitoren waren alle von analytischem Grad und wurden von Sigma in St. Louis, USA, erhalten.

Analytische Methoden

[0049] Die Aktivität des Gerinnungsfaktors VIII wurde durch einen Assay mit einem chromogenen Substrat festgestellt (Coatest Factor VIII, Chromogenix AB, Molndal, Schweden). Aktivierter Faktor X(Xa) wird über den intrinsischen Weg erzeugt, wo Faktor VIII als Cofaktor wirkt. Faktor Xa wird dann durch die Verwendung eines

synthetischen chromogenen Substrats, S-2222, in der Gegenwart eines Thrombininhibitors I-2581, um die Hydrolyse des Substrats durch Thrombin zu verhindern, bestimmt. Die Reaktion wird mit Säure gestoppt, und das VIII:C, welches proportional zu der Freisetzung von pNA (para-Nitroanilin) ist, wird photometrisch bei 450 nm gegenüber einem Reagens-Leerwert bestimmt. Die Einheit von Faktor VIII:C wird in internationalen Einheiten (IU) ausgedrückt, wie sie durch den derzeitigen Internationalen Konzentrat Standard (IS), der von der WHO eingeführt wurde, definiert sind.

[0050] Die Zellebensfähigkeit wurde bei mehreren Gelegenheiten bestimmt, wie in den Tabellen I-IV offenbart wird, um zu verifizieren, dass die zugegebenen Inhibitoren über den gesamten Produktionszeitraum hinweg keine negative Wirkung auf das Überleben der Zellen ausübten. Die Analysen wurden, nachdem die Zellen mit Erythrosin B angefärbt wurden, in einer Bürker-Kammer oder durch Flusszytometrie gemacht. Der Anteil an lebensfähigen Zellen wurde in Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen (%) berechnet.

Beispiel 1

[0051] Dieses Beispiel ist dazu gedacht, die Effizienz der vorliegenden Erfindung im Vergleich zu verschiedenen anderen Proteaseinhibitoren darzustellen.

[0052] CHO-Zellen wurden unter Wachstumsbedingungen in Spinner-Kolben in einem Vollmedium wie z.B. ASF oder einer Mischung von DMEM- und Ham's-Medium F-12 kultiviert. Anfangs betrug die Temperatur 37°C und der Zellgehalt ca. $0,7 \times 10^6$ Zellen/ml des Zellkulturmediums. Tag 0 wurde als der Tag definiert, an dem die Produktion begann. Die Temperatur wurde auf 34°C gesenkt. Am Tag 3 wurde das Kulturmedium durch ein frisches Medium, welches 0,5 mM Buttersäure beinhaltete, ersetzt, und der Zellgehalt wurde auf ca. 3×10^6 Zellen/ml des Zellkulturmediums eingestellt. Am Tag 4 wurde eine Suspension der Zellen in der Produktion zur kontinuierlichen Kultivierung in Polypropylenrörchen aliquotiert, und die Proteaseinhibitoren wurden zugegeben. Am Tag 5 wurde das Medium ersetzt und die Proteaseinhibitoren zugegeben. Ein Ersatz des Mediums wurde am Tag 6, am Tag 7, am Tag 10 (akkumulierter Wert nach 72 Stunden) durchgeführt. Am Tag 11 wurden die Experimente gestoppt. Eine Western Blot-Analyse zeigte, dass die Qualität des erzeugten Faktors im Wesentlichen unbeeinträchtigt war. Die Lebensfähigkeit war im Allgemeinen hoch. Der niedrigste Wert, 90%, wurde für die Kontrolle und Aprotinin am Produktionstag 11 erhalten.

[0053] Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen angegeben.

TABELLE I

Faktor VIII:C in Zellkulturmedium, welches Proteaseinhibitoren gemäß der Erfindung enthält

Test	Inhibitor, Konzentration	Tag 6, IU/ml	Tag 6, %	Tag 7, IU/ml	Tag 7, %	Tag 10, IU/ml	Tag 10, %	Tag 11, IU/ml	Tag 11, %	Akkumu- liert, IU/ml	Akkumu- liert, %
1	Kontrolle	2,93	100	7,2	100	24,5	100	12,5	100	47,1	100
2	Phosphoramidon, 0,015 mM	4,93	168	11,0	152	34,5	141	15,1	121	65,6	139
3	Phosphoramidon 0,15 mM	6,12	209	10,2	141	39,0	159	17,1	137	72,4	154
4	Chymostatin, 1,04 nM (0,625 µg/l)	5,48	187	12,5	174	33,7	138	15,7	126	67,4	143
5	Chymostatin, 10,4 nM (6,25 µg/l)	6,80	232	10,6	148	38,5	157	10,7	86	66,6	141

TABELLE II

Faktor VIII:C in Zellkulturmedium, welches Proteaseinhibitoren nicht gemäß der Erfindung enthält

Test	Inhibitor, Konzentration IU/ml	Tag 6, % IU/ml	Tag 7, % IU/ml	Tag 10, % IU/ml	Tag 11, % IU/ml	Akkumu- liert, IU/ml	Akkumu- liert, %
1	Kontrolle	2,93	100	7,2	100	24,5	100
2	Aprotinin, 0,3 µM	3,83	131	8,52	118	24,5	100
3	Aprotinin, 3,0 µM	3,96	135	8,42	117	24,1	98
4	Chloroquin, 0,625 µM	4,19	143	9,39	130	26,5	108
5	Chloroquin, 6,25 µM	3,75	128	7,19	100	25,5	104
6	L-Histidin, 0,52 mM	3,17	108	6,22	86	23,1	94
7	L-Histidin, 5,2 mM	2,17	74	4,64	64	8,16	33
						3,37	27
							18,3
							39

TABELLE III

Zellebensfähigkeit in Zellkulturmedium, welches Proteaseinhibitoren gemäß der Erfindung enthält

Test	Inhibitor, Konzentration	Tag 6, %	Tag 7, %	Tag 10, %	Tag 11, %
1	Kontrolle	97,4	97,5	91,4	90,7
2	Phosphoramidon, 0,015 mM	98,6	96,5	89,1	94,7
3	Phosphoramidon, 0,15 mM	98,8	96,7	91,3	93,1
4 Vergleich	Chymostatin, 1,04 nM (0,625 µg/l)	98,3	98,0	94,9	93,6
5 Vergleich	Chymostatin, 10,4 nM (6,25 µg/l)	95,3	95,9	91,6	94,0

TABELLE IV

Zellebensfähigkeit in Zellkulturmedium, welches Proteaseinhibitoren nicht gemäß der Erfindung enthält

Test	Inhibitor, Konzentration	Tag 6, %	Tag 7, %	Tag 10, %	Tag 11, %
1	Kontrolle	97,4	97,5	91,4	90,7
2	Aprotinin, 0,3 µM	97,7	98,4	93,8	89,4
3	Aprotinin, 3,0 µM	97,8	98,1	94,1	90,1
4	Chloroquin, 0,625 µM	98,0	95,3	90,1	92,5
5	Chloroquin, 6,25 µM	96,9	98,2	94,5	90,3
6	L-Histidin, 0,52 mM	98,0	98,0	92,5	92,8
7	L-Histidin, 5,2 mM	99,1	97,8	95,4	95,4

[0054] Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, erhöht die Gegenwart von Proteaseinhibitoren gemäß der vorliegenden Erfindung dramatisch die Möglichkeit, Faktor VIII:C zu erhalten. Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, hat die Gegenwart von verschiedenen anderen Proteaseinhibitoren eine sehr kleine oder sogar negative Wirkung auf

Faktor VIII:C. Aus Tabelle III ist ersichtlich, dass die erhöhte Produktion von Faktor VIII, die in Tabelle I dargestellt ist, nicht einer erhöhten oder verringerten Lebensfähigkeit der Zellen zugeschrieben werden kann. Weiterhin ist aus Tabelle IV ersichtlich, dass das Fehlen der Wirkung auf die Produktion von Faktor VIII, die in Tabelle II dargestellt ist, nicht eine Wirkung ist, welche einer verminderten Lebensfähigkeit der Zellen entgegenarbeitet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven rekombinanten humanen Koagulationsfaktors VIII in einem Zellkulturmedium, das die Expression und Sekretion des Polypeptides ermöglicht, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Inhibitor von metallabhängigen Proteasen, der aus der Gruppe bestehend aus Peptiden oder Peptidanalogen, die mit Phosphoramidaten funktionalisiert sind, während der Kultivierungszeit zum Zellkulturmedium zugesetzt wird, wobei die kultivierten Zellen einen biologisch aktiven rekombinanten humanen Koagulationsfaktor VIII exprimieren und sekretieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die metallabhängige Protease eine Metalloprotease ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Metallion, das für die Aktivität der metallabhängigen Protease erforderlich ist, aus der Gruppe bestehend aus Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} und Cd^{2+} ausgewählt ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Inhibitor der metallabhängigen Proteasen Phosphoramidon ist, das einen P-Leucin-Tryptophan-Rest enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Inhibitors der metallabhängigen Proteasen zwischen 1 μM und 1 mM beträgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Säugetierzelle ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Säugetierzelle aus der Gruppe bestehend aus Chinesischen Hamster Ovarien (CHO)-Zellen, Babyhamster Nieren (BHK)-Zellen, COS-Zellen und Hybridomzellen ausgewählt ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Zellkulturmedium ein serumfreies Medium ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der rekombinante Koagulationsfaktor VIII ein B-Domänen deletiertes Derivat des Faktors VIII voller Länge mit beibehalteter Gerinnungsaktivität ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das B-Domänen deletierte Derivat des Faktors VIII der rekombinante VIII SQ (r-VIII SQ) ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen