



HU000228091B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 091**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 00588**(22) A bejelentés napja: **2001. 03. 21.**(40) A közzététel napja: **2003. 06. 30.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2012. 10. 29.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/12** (2006.01)**A61K 38/36** (2006.01)**A61K 38/37** (2006.01)**A61K 38/43** (2006.01)**C12N 15/57** (2006.01)**C07K 147/45** (2006.01)**C07K 147/55** (2006.01)**C12N 9/64** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 01/03220

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0170968

(30) Elsőbbségi adatok:

00106225.6 2000. 03. 22. **EP****60/203,249** 2000. 05. 08. **US**

(73) Jogosult(ak):

Octapharma Biopharmaceuticals GmbH,
Martinsried (DE)

(72) Feltaláló(k):

Hauser, Charlotte, München (DE)**Hörster, Andrea, München (DE)****Schröder, Carola, München (DE)****Lehnerer, Michael, München (DE)**

(74) Képviselő:

Lengyel Zsolt, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Rekombináns véralvadási faktorok előállítására humán sejtvonalakon

(57) Kivonat

A találmány tárgya: eljárás humán véralvadási faktorok, előnyösen VIII és IX faktor előállítására humán sejtvonalon, mely stabilan expresszál vírustranszkripciót aktiváló proteinek és olyan vektort hordoz, melynek promótere funkcionálisan kapcsolódik véralvadási faktort kódoló DNS szekvenciához, feltéve, hogy a promóter nem olyan víruspromóter, melyet a vírustranszkripciót aktiváló fehérjék stimulálnak; a vektort hordozó immortalizált humán sejtvonal; a fenti eljáráshoz különösen előnyös VIII faktor muteinek; gyógyászati készítmények, melyek tartalmazzák a VIII faktor-muteinek, valamint ezen muteinek alkalmazása hemofília kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

A találmány tárgya: eljárás humán véralvadási faktorok, előnyösen VIII és IX faktor előállítására humán sejtvonalon, mely stabilan expresszál vírustranszkripciót aktiváló proteinek és olyan vektort hordoz, melynek promótere funkcionálisan kapcsolódik véralvadási faktort kódoló DNS szekvenciához, feltéve, hogy a promóter nem olyan víruspromóter, melyet a vírustranszkripciót aktiváló fehérjék stimulálnak; a vektort hordozó immortalizált humán sejtvonal; a fenti eljárásához különösen előnyös VIII faktor muteinek; gyógyászati készítmények, melyek tartalmazzák a VIII faktor-muteinek, valamint ezen muteinek alkalmazása hemofília kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

A hemofília olyan vérzéses megbetegedés, melynek oka a véralvadási kaskád protein-komponenseinek működési zavara. Az érintett alvadási faktortól függően a hemofíliának két típusát különböztetjük meg. Mindkét típusra jellemző, hogy gátolt az oldékony fibrinogén átalakulása oldhatatlan fibrinné. Mindkét betegség X-kromoszómához kötött, recesszíven öröklődik és főleg a férfiakat érinti.

Az A-hemofília 10000 férfi közül 1-2-t érint. Oka a VIII faktor elégtelen termelődése vagy hiánya. A VIII faktor nagyméretű, kb. 330 kDa nagyságú glikoprotein [Furie B., Furie B.C., Cell 53, 505-518. old.(1988)], mely fontos szerepet tölt be a véralvadási kaskádban. Polipeptid szekvenciája 3 régióra osztható: N-terminális régióra, mely az ún. A1 és A2 doménekéből áll, egy központi, B-doménből álló régióra és egy C-terminális régióra, mely az A3, C1 és C2 doménekéből épül fel. A vérben a VIII.faktor inaktív prekursorként van jelen. Erős, nem-kovalens kötéssel kapcsolódik a von Willebrand faktorkhoz(vWF), mely stabilizáló hordozófehérje szerepet tölt be. A trombin a VIII faktort 3 specifikus helyen(740, 372, 1689) proteolitikusan hasítja, ennek következtében a VIII faktor elkülönül a vWF-től és prokoaguláns szerepet tölt be a kaskádban. Az aktivált VIII. faktor a IX_a faktor kofaktoraként működik, ezáltal nagyságrendekkel gyorsítva meg a X.faktor proteolitikus aktivációját.

A B-hemofília 25000 férfi közül 1-nél fordul elő és a szerin proteáz IX. (Christmas) faktor elégtelensége okozza. Ez a 415 aminosavból álló polipeptid a májban termelődik, 56 kDa nagyságú glikoprotein formájában. Megfelelő működéséhez poszttranszlációs karboxilációra van szükség, mely kizárólag K. vitamin jelenlétében megy végbe.

Szokásos módon mindkét vérzészavar kezelése humán plazmából származó VIII vagy IX faktor-protein-koncentrátumokkal történik. Bár ez a kezelési mód hatékony, de magában hordozza különböző fertőző ágensek, pl. hepatitiszvírus, AIDS vírus vagy tromboemboligén faktorok átvitelének veszélyét. Más megoldásként leírtak több, rekombináns DNS-en alapuló módszert alvadási faktorok előállítására. E célból a VIII és IX faktor vad típusának megfelelő cDNS-eket izoláltak és megfelelő expressziós vektorokba klónozták (EP-A-160457 európai közzétételi irat, WO-01961/86 nemzetközi közzétételi irat, 4770999, 5521070 és 5521070 Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat).

A VIII faktor esetében az alegységek rekombináns expressziójára szolgáló eljárások, melyek segítségével alvadási aktivitással rendelkező komplexek állíthatók elő, a szakterületen jól ismertek (pl. az EP-A-150735, EP-A-232112, EP-A-0500734. európai közzétételi irat, WO-07490/91, WO-13300/95. nemzetközi közzétételi irat és az 5045455. és 5789203. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat). Emellett olyan, csontolt cDNS-változatok expresszióját is leírták, amelyekből részben vagy teljesen hiányzott az erősen glikozilált B-domént kódoló szekvencia (pl. a WO- 06101/86, WO-04187/87, WO-07144/87, WO-00381/88, nemzetközi közzétételi irat, EP-A-251843, EP-A-253455, EP-A-254076. európai közzétételi irat, a 4868112 és 4980456. Amerikai

Egyesült államokbeli szabadalmi irat, valamint az EP-A-294910, EP-A-265778, EP-A-303540. európai közzétételi irat és a WO-09122/91. nemzetközi közzétételi irat). Újabban a kiválasztott pontmutációknak egyik változatát alkalmazzák abból a célból, hogy gátolja a VIII faktor aktivált protein C általi inaktiválását, vagy csökkentsék az immunogenitást, mely a kezelt páciensekben gátló antitestek kialakulását eredményezi (ld. 5859204., 5422260., 5451521. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat, a WO-49725/97 és WO-29848/99 nemzetközi közzétételi irat).

A rekombináns alvadási faktorokat rendszerint stabilan transzfektált eukarióta, előnyösen emlős sejtvonalak tápközegéből izolálták. Mindamellett, az említett forrásmunkákban ismertetett előállítási módszerek szerint a nem-humán sejtvonalak alkalmazása általánosan elfogadott volt, annak érdekében, hogy elkerüljék egyes fertőző ágensek egyidejű tisztításának kockázatát, amelyeket a humán sejtek képesek hordozni és expresszálni.

A nem-humán sejtvonalak alkalmazása, különösen a VIII faktor előállítását illetően, bizonyos hátrányokkal járt. Előfordult például, hogy az expresszált fehérje szekréciós szintje a tápközegben elégtelen volt. Ennek okát képezhetik a különböző típusú emlőssejtek közötti enyhe eltérések, amelyek a fehérje-transzláció és átalakulás intracelluláris útjaira vonatkoznak, és hatással lehetnek az expresszált polipeptid biológiai aktivitására. Ettől eltekintve olyan aggályok merültek fel, hogy a nem-humán expressziós rendszerekből tisztított, gyógyhatású fehérjék olyan sejtkomponensekkel szennyeződhetnek, amelyek a páciensben antigén-reakciót válthatnak ki.

Emellett a nem-humán expressziós rendszerek által expresszált fehérjék olyan, nem-humán glikozilációs mintázatot tartalmazhatnak, mely a páciensben antigénreakciót eredményezhet. Mindenesetre, az alvadási faktorok biológiai stabilitását és hatékonyságát nagymértékben befolyásolja N-glikozilációs mintázatuk. Különösen a perifériás és terminális monoszacharidoknak van jelentősége, mivel ezeket a degradációjukért felelős sejtek specifikus receptorai ismerik fel. A véralvadási faktorok terminális monoszacharidjai szialsav-oldalláncok. A szialsav összetételének változásai a glikoproteinek, pl. az alvadási faktorok „antennáiban”, heterogén glikozilációs mintákat eredményezhetnek. Ha a változás bekövetkezik, döntő módon befolyásolja a biológiai stabilitást és hatékonyságot. Ezért a rekombináns véralvadási faktorok előállításánál fontos szempont a nem-humán és humán sejtvonalak glikozilációja hatásának vizsgálata. Valószínűnek tűnik, hogy a humán sejtvonalak alkalmasabbak rekombináns alvadási faktorok előállítására, mint a nem-humán sejtvonalak. E feltételezés okát az képezi, hogy a rekombináns faktorok szintézise során az oligoszacharid-molekuláriszbe valószínűleg nem épül be idegen oligoszacharid.

Egy ideje hozzáférhetőek olyan általános eljárások, amelyek a kívánt génnek magas szintű fehérje-expresszióját teszik lehetővé (pl. 5712119. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat). Ezekben az eljárásokban immortalizált, stabilan transzfektált emlős sejtvonalakat alkalmazunk, melyek vírustranszkripciót aktiváló fehérjéket expresszálnak. A továbbiakban ezeket a sejteket olyan vektor-konstrukcióval transzformálják, amelyben megfelelő vírustranszkripció promóter működőképesen kapcsolódik egy, a jelentőséggel bíró gént meghatározó DNS szekvenciához, a transzkripciót aktiváló fehérjék aktiválják a vírustranszkripció-promótert, ezáltal iniciálva a kiválasztott gén expresszióját. Ezzel kapcsolatban is felmerültek olyan aggályok, hogy ezen sejtvonalak által expresszált, transzkripciót aktiváló fehérjék szennyeződéseket eredményezhetnek a terápiás célfehérjén.

A fentiek ismeretében szükség van humán véralvadási faktorok hatékony előállítására szolgáló eljárásra.

Meglepő módon arra a következtetésre jutottunk, hogy szennyeződésmentes véralvadási faktorokat elő lehet állítani immortalizált humán sejtvonalak alkalmazásával.

Közelebbről, az immortalizált sejtvonalak képesek a véralvadási faktor expresszáására, ha olyan vektort hordoznak, melynek promótere funkcionálisan kapcsolódik a véralvadási faktort kódoló DNS szekvenciához, annak ellenére, hogy a promóter nem olyan víruspromóter, amelyet a vírustranszkripciót aktiváló fehérjék stimulálnak. Az eljárást megfelelő fehérje-tisztítási- és vírus-inaktivációs protokollokkal kombinálva hatékony rendszert nyerünk embergyógyászati célra alkalmas, biztonságos és erősen aktiv rekombináns véralvadási faktorok előállítására. Ráadásul úgy találtuk, hogy különösen a VIII faktor muteinek proteolitikus inaktivációval szemben rendkívül stabilak, így erőteljes vírus inaktivációs protokolloknak vethetők alá.

A találmány tárgya:

- (1) eljárás rekombináns humán véralvadási faktor előállítására, amely szerint:
 - (a) immortalizált humán sejtvonalat tenyésztünk, mely stabilan expresszál legalább 1 vírustranszkripciót aktiváló fehérjét, és olyan vektort hordoz, melynek promótere funkcionálisan kapcsolódik a véralvadási faktort kódoló DNS-szekvenciához, amennyiben a promóter nem olyan víruspromóter, melyet legalább egy, vírustranszkripciót aktiváló fehérje stimulál és
 - (b) a véralvadási faktort a tápközegből izoláljuk;
- (2) az (1) pontban bemutatott eljárás előnyös megvalósítási módja, mely szerint a humán véralvadási faktor VIII faktor vagy annak muteinjé;
- (3) a 2. pontban bemutatott eljárás előnyös megvalósítási módja, ahol a VIII faktor olyan mutein, mely legalább 1-et tartalmaz az alábbi mutációk közül:
 - (a) a 162. Val helyettesítése más semleges aminosav-oldallánccal,
 - (b) a 2011. Ser helyettesítése más hidrofíli aminosav-oldallánccal
 - (c) a 2223. Val helyettesítése savas aminosav-oldallánccal vagy
 - (d) a 740. Arg és 1649. Glu közötti B-domén helyettesítése argininban gazdag kapcsolópeptiddel, mely 10-25, előnyösen 14-20 aminosav-oldallancot tartalmaz.
- A VIII faktor számozását az érett vad típusú VIII faktor 2. azonosítószámú szekvenciájához viszonyítjuk;
- (4) az 1. pontban bemutatott eljárás előnyös megvalósítási módja, mely szerint a humán alvadási faktor IX faktor, vagy annak muteinjé;
- (5) immortalizált humán sejtvonal, mely az előző pontokban ismertetett humán véralvadási faktorokat kódoló vektort hordoz;
- (6) a (3) pontban ismertetett VIII faktor-mutein;
- (7) DNS szekvencia, mely a (6) pontban ismertetett VIII faktor-muteint kódolja,
- (8) Vektor, mely tartalmazza a (7) pontban ismertetett DNS szekvenciát;
- (9) A (8) pontban ismertetett vektor, amely géntranszfer-vektor;
- (10) gazdasejt, mely transzformálva van a (8) pontban ismertetett vektorral és/vagy tartalmazza a (7) pontban ismertetett DNS szekvenciát;
- (11) gyógyászati készítmény, mely tartalmazza a (6) pontban ismertetett VIII faktor-muteint vagy a (9) pontban ismertetett géntranszfer-vektort;
- (12) a (6) pontban ismertetett VIII faktor-mutein vagy a (9) pontban ismertetett géntranszfer-vektor alkalmazása hemofília kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására és
- (13) hemofília kezelésére alkalmas eljárás, mely szerint a (6) pontban ismertetett VIII faktor-muteint vagy a (9) pontban ismertetett géntranszfer-vektort hemofiliás személyeknek beadjuk

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

Az 1. ábrán azokat a fragmenseket mutatjuk be, amelyeket a deletált B-doménnel rendelkező VIII faktor konstruálásánál alkalmaztunk.

A 2. ábrán a pTGF8-1 vektort mutatjuk be, mely 8720 bázispár hosszúságú cirkuláris DNS, amelynek a pontos DNS szekvenciáját a 3. azonosítószámú szekvencia adja meg (a VIII faktor proteinjét kódoló DNS szekvenciát a 4. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be).

A 3. ábrán a pTGF36 vektort mutatjuk be, mely 5753 bázispár hosszúságú cirkuláris DNS, amelynek a pontos DNS szekvenciáját a 6. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be (689-2071. bázisok a IX faktor proteint kódoló 6. azonosítószámú szekvenciában).

A 4. ábrán a pTGF36hyg vektort mutatjuk be, mely 8124 bázispár hosszúságú cirkuláris DNS.

Az 5.A ábrán találmány szerinti előnyös kapcsolószekvenciát mutatunk be (9. azonosítószámú szekvencia).

Az 5.B ábrán a rekombináns hFVIII alvadási idejét mutatjuk be a 6. példában leírtak szerint.

A 6. ábrán a pTGF8-2hyg-s és pTGF8-3 közös molekuláris szerkezetét mutatjuk be, mely 10698 bázispár hosszúságú cirkuláris DNS, amelynek a pontos DNS szekvenciáját a 12. és 14. azonosítószámú szekvenciákon mutatjuk be (a VIII faktor proteint kódoló DNS szekvenciát a 13. és 15. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be).

A 7.A ábrán a FVIII ELISA kalibrációs görbét mutatjuk be az 5. példában leírtak szerint.

A 7.B ábrán a rekombináns FVIII koncentrációk meghatározásának eredményeit mutatjuk be, különböző tenyészetek szűrletében, az 5. példában leírtak szerint.

A 8. ábrán bemutatjuk a VIII faktor-specifikus immunofluoreszcenciás vizsgálat eredményeit a 9. példában leírtak szerint. Felső sor: pTGF8-3-mal stabilan transzfektált 293T sejtek(49/19-es klón). Alsó sor: nem transzfektált 293T sejtek (negatív kontroll). A és C: fehér fény, szűrő nélkül; B és D: VIII faktor detektálása fluoreszcenciával, 550 nm-es filter.

A 9. ábrán mutatjuk be a hőkezelés hatását a FIX aktivitására tenyészet szűrletben, a 10. példában leírtak szerint.

A 10. ábrán mutatjuk be az aktív rekombináns IX faktor expressziójának alakulását a tápközeghez adott K vitamin függvényében.

A „funkcionálisan kapcsolt” megnevezés a vektornak azon konfigurációira vonatkozik, amelyekben a promóter úgy helyezkedik el a vektoron belül, hogy stimulálni képes a humán véralvadási faktort kódoló DNS szekvencia transzkripcióját. A „nem funkcionálisan kapcsolt” megnevezés olyan konfigurációra utal, mely szerint a promóter olyan távol helyezkedik el a véralvadási faktor expresszált génszekvenciájától, hogy nem képes stimulálni a transzkripciót.

A „gén” megnevezés polipeptidet kódoló DNS szekvenciára vonatkozik, mely adott esetben vezető-és követő-szekvenciákat, intronokat és exonokat tartalmazhat.

A „vektor” megnevezés bármely genetikai konstrukcióra (pl. plazmid, fág, kozmid, stb.) vonatkozik, amelyik megfelelő szabályozó elemekkel társítva replikációra képes.

A megnevezés a klónozó- és expressziós hordozókra is vonatkozik.

A „vektort hordoz” kifejezés a funkcionális DNS-ek gazdasejtbe való, stabil vagy átmeneti beépülésére vonatkozik. A stabil beépülést előnyösnek tartjuk.

A találmány szerinti „géntranszfer vektor” megnevezés génterápiára alkalmas vektort jelöl. A vektor tartalmazza a kívánt funkcionális szekvenciákat, melyek a szakterületen jól ismertek.

Az „érett” megnevezés adott protein molekulaszervezetére vonatkozik közvetlenül a sejtből történő szekrécióját követően (vagyis hiányzik az N-terminális export-szignál polipeptidje).

A „promóter” megnevezés a regulátor DNS szekvencia azon régiójára vonatkozik, mely az RNS polimerázt kötő gén transzkripciójáért felel.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény „terápiásan hatékony dózisa” az a dózis, mely kezelés vagy megelőzés során hatékonyan bizonyul, pl. hatékonyan kezeli vagy csökkenti a hemofília tüneteit. A terápiásan hatékony dózis megállapítása a területen jártas szakember hatáskörébe tartozik.

A „kódol” vagy „kódolás” a nukleinsav szekvencia azon tulajdonságára vonatkozik, hogy megfelelő regulátor szekvencia jelenlétében, *in vitro* vagy *in vivo* polipeptidbe átirható (DNS esetében) vagy transzlálható (RNS esetében). A leírás értelmében az „expresszáll”, „expresszálla”, „expresszió” kifejezés a proteint kódoló gén transzkripciójára és transzlációjára vonatkozik.

A továbbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

Az (1) pontban ismertetett megvalósítási mód szerint a véralvadási faktort kódoló DNS szekvenciához funkcionálisan kapcsolódó promóter nem olyan víruspromóter, melyet az immortalizált humán sejtvonalon expresszállt, legalább 1 vírustranszkripciót aktiváló fehérje stimulál.

Az immortalizált humán sejtvonal előnyösen immortalizált vese-, hólyag-, máj-, tüdő-, szívizom-, simaizom-, petefészek- vagy gasztrointesztinális sejt. Még előnyösebb, ha az immortalizált humán sejtvonal humán embrionális vese-sejtből származik, legelőnyösebb, ha 293 T sejtvonal (ECACC: tsa201, ref.96121229; DSM ACC2494).

Az immortalizált sejtvonalon expresszállt, legalább 1 transzkripciót aktiváló fehérje lehet Simian vírus T-antigén, E1A vagy E1B adenovírus fehérje, a bovin papillomavírus korai régiójának DNS szekvenciája által kódolt fehérje és herpeszvírus IE fehérje. Előnyösen az immortalizált sejt legalább 2, vírustranszkripciót aktiváló fehérjét expresszáll, pl. a hőérzékeny SV40 T-antigént és adenovírus E1A fehérjét (mint a fenti 293T sejtvonal).

A humán véralvadási faktort kódoló DNS szekvenciához funkcionálisan kapcsolódó promóter előnyösen lehet:

- (i) víruspromóter, amelyeket nem stimulál az immortalizált sejteken expresszállt aktiváló fehérje (mint pl. az SV40 és a CMV);
- (ii) „housekeeping” gazdapromóter (albumin) és
- (iii) szövetspecifikus promóter (pl. a májban lévő α -antitripszin). A találmány szerinti legelőnyösebb promóter CMV promóter (amennyiben az immortalizált sejten expresszállt, transzkripciót aktiváló fehérje nem stimulálja a promótert).

A találmány szerinti vektor további olyan víruspromótereket hordozhat, amelyeket a vírustranszkripciót aktiváló fehérjék stimulálnak, de funkcionálisan nem kapcsolódnak a véralvadási faktorhoz. Ilyen víruspromóter lehet: adenovírus, Rous-szarkóma-vírus vagy citomegalovírus. A vektor tartalmazhat még 1 vagy több szekvenciát az alábbiak közül: szelekciós markerek, regulátor szekvenciák (pl. PRE), stb.

A humán véralvadási faktor az (1) pontban ismertetett megvalósítási mód szerint nem korlátozó módon, a következő lehet: IX faktor, VIII faktor, VII faktor, V faktor, von Willebrand faktor (vWF) és mások.

A (2) pontban ismertetett előnyös megvalósítási mód szerint a vektor olyan DNS szekvenciát tartalmaz,

mely a VIII faktort vagy muteinjét kódolja. Míg a rekombináns IX faktor szerkezetileg általában azonos a vérplazmából izolált vad típusú proteinnel, a VIII faktor rekombináns expressziójára több, módosított expressziós konstrukciót is előállítottak. A VIII faktor funkcionális polipeptidjének doménszerkezetét tekintve az A3 (1680-1689-es as.) és C2 doménben [Kaufman és Pipe, *Haemophilia* 4, 370-379. old.(1998)] helyezkednek el azok a fontos interakciós helyek, ahol a vWF-al kölcsönhatásba lép. Az 1689. aminosav utáni hasítás lehetővé teszi, hogy a VIII faktor leváljon a vWF-ről és kölcsönhatásba lépjen a töltéssel rendelkező foszfolipidekkel. Azok a VIII faktor-konstrukciók, amelyeknek hiányzott a vWF-kötőhelye, VIII faktor-hiányos egerekbe fecskendezve fokozott hajlamot mutattak a proteolitikus emésztésre. Csonkolt VIII faktor-konstrukciók emlőssejt kultúrákon történő rekombináns expressziójával bebizonyosodott, hogy a B-domén teljes deléciója nem változtatja meg a megfelelő, VIII faktor-szerű protein biológiai aktivitását [Eaton és mts., *Biochemistry* 25., 8343-8347. old (1986)]. Ráadásul a B-domén-hiányos konstrukciók megfigyelt expressziós rátái jelentősen magasabbak voltak, mint a vad típusú VIII faktoréi, ami a sejtek mRNS-szintjének emelkedésével magyarázható [Pittman és mts., *Blood* 81, 2925-2935. old.(1993)]. Jelenleg 4, rekombináns VIII faktort tartalmazó készítmény van forgalomban (Recombinate® Baxter Health Care; Kogenate® és Kogenate FS® Bayer Corporation és Refacto® Wyeth, Genetics Institute).

A találmány (3) pontjában ismertetett előnyös megvalósítási mód szerint a VIII faktor muteinje legalább 1 mutációval rendelkezik az alábbi, (a)-(d) mutációk közül:

- (a) a 162. valint más semleges aminosav-oldallánccal helyettesítettük;
- (b) a 2011. szerint más hidrofíli aminosav-oldallánccal helyettesítettük;
- (c) a 2223. valint más savas aminosav-oldallánccal helyettesítettük;
- (d) a 740. arginin és a 1649. glutamin közötti B-domént argininban gazdag kapcsolópeptiddel helyettesítettük, mely 10-25, előnyösen 14-20 aminosav-oldallánccot tartalmaz.

A VIII faktor számozását a vad típusú VIII faktor 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciájához viszonyítjuk [az érett peptid aminosav-szekvenciája nem tartalmazza a 19 aminosavból álló szignálpeptidet, de tartalmazza a teljes B-domént (WO 29848/99 Nemzetközi Közzétételi Irtat)].

A „más semleges aminosav-oldallánc” a találmány szerint Gly, Ala, Leu, Ile, Met és Pro, előnyösen Ala lehet. A „más hidrofíli aminosav” Asn, Thr és Gln, előnyösen Asn. A savas aminosav-oldallánc Glu és Asp, előnyösen Glu lehet.

A találmány (3) pontban ismertetett megvalósítási módja szerint a VIII faktor muteinje legalább 1-et tartalmaz az (a), (b) és (c) pontban ismertetett mutációk közül, előnyösen az (a) és (b) mutációk valamelyikét, legelőnyösebben valamennyi, (a), (b) és (c) pontban felsorolt mutációt. Különösen előnyös, ha a mutein a következő mutációkat tartalmazza: V162A, S201N és V2223E.

A DNS szekvencia, melyet a találmány szerinti (4) pontban ismertetett vektor foglal magában, a T485C, G6032A és T6668A mutációkkal rendelkezik, amelyeket az érett, vad típusú VIII faktor 1. azonosítószámú DNS szekvenciájához viszonyítunk. Előnyös megvalósítási mód szerint a DNS szekvencia a T6816C csendes mutációt is tartalmazza (ennek számozását is az érett, vad típusú VIII faktor DNS szekvenciájához viszonyítjuk).

A találmány (3) pontban ismertetett megvalósítási módja szerint egyébként előnyös, ha a VIII faktor muteinje a (d) pontban leírt mutációt tartalmazza.

A találmány szerinti expressziós rendszer egy egyedi VIII faktor-muteint alkalmaz, amelynek -az (a)-(c)

pontokban ismertetett pontmutációk mellett- részlegesen vagy teljesen hiányzik a B-doménje; előnyösen az R740 és E1649 pozíciók közötti B-domént jellegzetes, argininban gazdag aminosav-távtartóval helyettesítjük, a (d) pontban leírtak szerint.

A találmány szerint az „argininban gazdag” kifejezés azt jelenti, hogy a távtartó legalább 3, előnyösen legalább 4 arginin-oldalláncot tartalmaz. A legelőnyösebb megvalósítási mód szerint a távtartó a vad típusú B-domén legalább 8 aminosavjából épül fel, melyet egy variábilis domén 8 aminosavja követ (ld. az 5A ábrát és a 9. azonosítószámú szekvenciát).

A leírt B-domén-módosításokat tartalmazó konstrukcióban az ajánlott vWF kötőhely változatlan marad, így megelőzhető a szekretált VIII faktor azonnali proteolitikus emésztődése a tápközegben vagy később, a kezelt páciens vérében. Csak a trombinnal történő hasítás specifikus aktiváló hatását követően válik le a VIII faktor a vWF-ről. Az előnyös VIII faktort kódoló cDNS-t pl. 4 DNS fragmentum összeillesztésével konstruáltuk, az 1. példában leírtak szerint.

A találmány (3) pontban ismertetett megvalósítási módja szerinti protein további N- vagy C-terminális szekvenciákat tartalmazhat, nem korlátozó jelleggel tartalmazhatja a természetes export-szignál-peptidet, (mely a 4., 13. és 15. azonosítószámú szekvenciákkal jellemzett proteinek -19-től -1-ig terjedő aminosav-szekvenciáinak felel meg), annak fragmensét vagy analógiát, mesterséges peptideket (pl. oligo-His címkék), stb.

A VIII faktort expresszáló legelőnyösebb vektor a pTGF8-1, melyet a 2. ábrán mutatunk be. A vektor DNS-szekvenciája a 3. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be, és tartalmazza az említett 5 mutációt [a T485C, G6032A, T6668A és T6816C muteinek, itt T1217C, G4088A, T4724A és T4872C) és egy DNS szekvenciát, mely a B-domént kapcsoló, 9. azonosítószámú szekvencián bemutatott, B-domént kapcsoló szekvenciát kódolja), és a 4. azonosítószámú szekvenciában ábrázolt VIII faktor-muteint kódolja.

További legelőnyösebb vektorok a pTGF8-2hyg-s és pTGF8-3, amelyek közös molekuláris szerkezetét a 6. ábrán ábrázoljuk.

A 12. azonosítószámú szekvenciával ábrázolt pTGF8-2hyg-s csak a T6816C csendes mutációt tartalmazza. Ennek eredménye olyan VIII faktor-mutein, melynek B-doménjét a 9. azonosítószámú szekvenciával ábrázolt kapcsolópeptid szubsztituálja, de nem okoz további változást az elsődleges fehérjeszerkezetben a 2. azonosítószámú szekvencián bemutatott vad típusú szekvenciához viszonyítva.

A pTGF8-3 vektor, melyet a 14. azonosítószámú szekvencia ábrázol, a T485C, T6668A és T6816C mutációkat tartalmazza, melynek eredményeként (a 2. azonosítószámú szekvenciához viszonyítva) a V162A és V2223E aminosav-szubsztitúciókat tartalmazó VIII faktor-mutein jön létre, a fent ismertetett B-domén-szubsztitúció mellett.

VIII faktor előállításánál során a tenyésztés von Willebrand faktor jelenlétében történik. Utóbbit előnyösen 10-100, még előnyösebben 50-60 mol mennyiségben alkalmazzuk, 1 mol VIII faktorra számítva (a tápközegben és/vagy a VIII faktor oldatában, a tisztítási eljárás során)

A találmány (4) pontban ismertetett előnyös megvalósítási módja szerinti véralvadási faktor a IX faktor vagy annak muteinje, előnyösen az 5. azonosítószámú szekvenciában ábrázolt vad típusú IX faktor. Megfelelő muteinek például a IX faktor pontmutált és csontolt alakjai, legelőnyösebb expressziós vektorai a PTGFG36 és PTG36hyg, amelyeket sorrendben a 3. és 4. ábrán mutatunk be.

IX faktor előállításánál során a tenyésztés előnyösen K vitamin jelenlétében történik, mely 0,1-100 µg/ml tápközeg mennyiségben, még előnyösebb, ha 1-20 µg/ml tápközeg mennyiségben van jelen.

A találmány (1) megvalósítási módja szerinti eljárás további lépései szerint:

- (c) a (b) pontban izolált véralvadási faktort tisztítjuk és/vagy
- (d) a (b) pontban izolált és (c) pontban tisztított véralvadási faktort vírus-inaktivációs kezelésnek vetjük alá.

Az alkalmas tisztítási lépések közé tartoznak olyan eljárások, amelyekről ismert, hogy maximalizálják nagy tisztaságú, stabil és erősen aktív termék keletkezését. Választható tisztítási eljárások: immunaffinitás-kromatográfia, anioncserélő-kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia, stb., valamint ezek kombinációi. A véralvadási faktorok részletes tisztítási protokolljait humán vérplazmából pl. a WO15105/93. nemzetközi közzétételi irat, az EP08135/97 európai közzétételi irat, a WO40883/96. és a 15140/50/96. nemzetközi közzétételi irat ismerteti.

Ezek a tisztítási protokollok könnyűszerrel adaptálhatók a rekombináns VIII és IX faktorok izolálása során felmerülő speciális kívánalmakhoz. A IX faktor tisztítására bevezetett hatékony protokoll első lépése ammónium szulfátos precipitáció, melyet DEAE és HIC „tentacle” kromatográfia, valamint heparin affinitás-kromatográfia követ (S919909. Amerikai Egyesült államokbeli találmány).

A tisztított protein mennyisége és aktivitása a tisztítási eljárás során és azt követően ELISA és koagulációs vizsgálattal követhető.

Annak érdekében, hogy legyőzzük a fertőző ágensek okozta kontaminációt a tisztított proteinmintákban vagy a termékben, melyet közvetlenül a szekretált rekombináns proteint tartalmazó sejtenyészet felülszójából nyertünk, utóbbit és/vagy a mintákat vírus-inaktivációs eljárásoknak pl. hőkezelésnek vethetjük alá, mely lehet száraz vagy folyékony állapotban történő hőkezelés, vegyi anyagok(pl. proteáz-inhibitorok) hozzáadásával vagy anélkül. A vírus -inaktivációt újabb tisztítási folyamat követheti, mely a vegyi anyagok eltávolítását célozza. A WO15105/93 nemzetközi közzétételi irat szerint anion -kromatográfiás eljárással vérplazmából nyertek nagy tisztaságú, vírusinaktivált VIII faktor-proteint. További eljárásokról is beszámoltak, melyek segítségével vérplazmából vagy más biológiai forrásból nagy tisztaságú, fertőzésmentes alvadási faktorokat lehet előállítani. A lipiddel bevont vírusok hatékonyan inaktiválhatók úgy, hogy a potenciálisan fertőző anyagot hidrofób fázist képező, kétfázisos rendszerrel kezeljük, majd a vízben oldhatatlan részt eltávolítjuk. Kiegészítésként, a hidrofób fázisos kezeléssel egy időben vagy azt követően nemionos biokompatibilis detergenssekkel és dialkil- vagy trialkil- foszfátokkal kezelhetjük az anyagot (WO36369/96. nemzetközi közzétételi irat, EPO13331740. európai közzétételi irat, 6007979. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat).

A nem-lipid bevonatú vírusok inaktivációs protokollja szerint a vírust nemionos detergensekkel kezelik, majd 60-65°C-on néhány órán át hőkezelik (WO17834/94 Nemzetközi Közzétételi Irat).

A fenti eredmények tükrében úgy tűnik, hogy a humán sejtvonalon alapuló, hatékony protein-expressziós rendszer, a potenciálisan veszélyes infekciós ágenseket inaktiváló eljárásokkal kombinálva biztonságosan és egyszerűen alkalmazható rekombináns véralvadási faktorok előállítására.

A találmány szerinti (6) pontban ismertetett megvalósítási mód kiváló VIII faktor mutánszt biztosít, mely lehet gyógyászati készítmények alkotója, alkalmazható hemofília kezelésére szolgáló gyógyszerek előállítására és hemofília kezelésére alkalmas eljárásokban, a találmány szerinti (11)-(13) pontban ismertetett megvalósítási módoknak megfelelően. A fenti gyógyászati készítmények és gyógyszerek terápiásan hatékony dózisban tartalmazhatják a VIII faktort, pl. 50-500 µg dózisban, ahol 200 ng VIII faktor 1 Nemzetközi Egységnek (NE) felel meg. A hemofília típusától függően a páciens évi több mint 20000NE VIII faktort kap, melynek beadására he-

tente egyszer vagy kétszer kerül sor.

A gyógyászati készítmények, gyógyszerek vagy preparátumok, amelyeket a (11)-(13) pontokban ismertetett megvalósítási módok szerint hemofília kezelésére szolgáló eljárások során alkalmazunk, terápiásan hatékony dózisban tartalmazzák a (6) pontban ismertetett megvalósítási mód szerinti VIII faktor-mutaint, vagy a (9) pontban ismertetett géntranszfer-vektort. Előző tartalmazhat még gyógyászatiilag elfogadható adalékanyagokat, pl. humán szérumalbumint(HSA), előnyösen kb. 1 mg/ml mennyiségben; szerves sókat, pl. CaCl_2 -t, előnyösen 2-5 mM-t; aminosavakat, pl. glicint, lizint, hisztidint, előnyösen 0,1-1M mennyiségben aminosavanként; diszacharidokat, pl. szacharózt és/vagy trehalózt, előnyösen 0,4-1M mennyiségben; szerves sókat, pl. Na-citrátot, előnyösen maximum 50 mM mennyiségben, stb. A készítmények vizesek vagy nem-vizesek lehetnek, utóbbi esetben fő komponensük a glicerin és/vagy polietilén-glikol (pl. PEG-300). A készítmény por alakú is lehet, ez esetben a beadást megelőzően feloldandó a megfelelő oldószerben.

A fentiek értelmében, a találmány (9) pontjában ismertetett megvalósítási mód szerinti géntranszfer-vektor is lehet

Gyógyászati készítmények alkotóeleme, alkalmazható hemofília kezelésére szolgáló gyógyszerek előállítására és hemofília kezelésére alkalmas eljárásokban, a találmány (11)-(13) pontjában ismertetett megvalósítási mód szerint. A gyógyászati készítmények és gyógyszerek további, megfelelő mátrix komponenseket tartalmazhatnak, pl. lipideket vagy hormonokat, a WO 49147/00. nemzetközi közzétételi iratban leírtak szerint, ami hivatkozás útján a kitanítás részét képezi. A géntranszfer-vektort, vagy a találmány szerinti géntranszfer-vektort tartalmazó gyógyászati készítmény vagy gyógyszer beadható orálisan, intravénásan, intramuszkulárisan, szubkután, helyileg, nyálkahártyán keresztül (beleértve a száj-és orrsprayt) vagy génágyú útján. Az orális bejutatás (pl. mikronizált hormondiszperzió formájában) előnyös.

A (6) pontban ismertetett megvalósítási mód szerinti VIII faktor-mutain előnyösen megfelel a (3) pontban ismertetett mutainnak.

A továbbiakban a VIII faktor-mutain standard rekombinációs módszerekkel állítható elő, pl. egy olyan eljárással, mely szerint:

- (a) gazdasejtet tenyésztünk, melyet a (8) pontban ismertetett vektorral transzformáltunk, és/vagy tartalmazza a (7) pontban ismertetett megvalósítási mód szerinti DNS-t (ez magában foglalja immortalizált humán sejtvonal tenyésztését is, mely stabilan expresszál legalább 1, vírustranszkripciót aktiváló fehérjét és olyan vektort hordoz, amelynek vírustranszkripció promótere funkcionálisan kapcsolódik a humán véralvadási faktort kódoló DNS szekvenciához és ahol a víruspromótert legalább 1, vírustranszkripciót aktiváló fehérje stimulálja); és
- (b) a tápközegből izoláljuk a véralvadási faktort.

A megfelelő immortalizált humán sejtvonalakat, transzkripciót aktiváló fehérjéket és víruspromótereiket az előzőekben ismertettük. Az immortalizált humán sejtvonal előnyösen 2, vírustranszkripciót aktiváló proteint expresszál, legelőnyösebben a hőérzékeny, SV40 T-antigént és adenovírus E1A proteint. Az eljárás részét képezheti továbbá az előbbieken ismertetett tisztítás (c) és vírus-inaktiváció (d).

A kereskedelmi forgalomban kapható 293T sejtvonalat (ECACC: tsa201, ref. 96121229) letétbe helyeztük a DMSZ-nél (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany), 2001.02.20-án, és az a DSM ACC2494 letéti számot kapta.

A továbbiakban példákon keresztül illusztráljuk a találmányt.

1. példa: VIII faktor klónozása: a rekombináns VIII faktort kódoló szekvenciát reverz transzkripcióval állítottuk elő egy teljes humán hepatocelluláris RNS készletből. Ezt követően 4 fragmenst (1/2, 3/4, 5/6, 7/8) standard PCR-el amplifikáltunk, olyan láncindítókat alkalmazva, amelyek restrikciós helyeket tartalmaztak. A 3/4 és 5/6 fragmensek összeillesztésére a pBSFVIII3/4 plazmid SmaI/SalI fragmensét tompa véggel a pBSFVII5/6 plazmid SalI helyére inszertáltuk, így a pBSFVIII3/6 plazmidot nyertük. Ezután a 3/6 fragmenst úgy állítottuk elő, hogy a pBSFVIII3/6 plazmidot XhoI/BspHI és részben Alw44I enzimmel emésztettük. Ezt a fragmenst a pBSFVIII1/2 plazmidból származó PstI/Alw44I fragmenssel egy lépésben a pBSFVIII1/2 plazmid vektorába ligáltuk, PstI és XhoI enzimmel emésztettük, ezáltal a pBSFVIII1/6 plazmidot nyertük. A 7/8 fragmenst úgy állítottuk elő, hogy a pBSVIII7/8 plazmidot SmaI és részben Mva1269I enzimmel emésztettük és pBSFVIII1/6 vektorba ligáltuk, amit XhoI és Mva1269I enzimmel hasítottuk, miáltal a pBSFVIII1/8 plazmidot nyertük. Végül a pBSFVIII1/8 plazmid SmaI/XhoI fragmensét tompa véggel a pTGF67 (Octagene) vektor SalI helyére inszertáltuk (a vektor előállítását a PCT/EP00/01368 nemzetközi bejelentés ismerteti) és így módon a humán VIII faktor pTGF8-1 eukarióta expressziós vektorát nyertük (ld. az 1. és 2. ábrát). Ez a vektor kódolja a V162A, S2011N és V2223E mutációkat tartalmazó VIII faktor-mutánt.

2. példa: a IX faktor klónozása: a pUC19 (MBI Fermentas) vektort XbaI enzimmel emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük és újraligáltuk. Ezt az XbaI deletált vektort EcoRI enzimmel emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük és újraligáltuk annak érdekében, hogy az EcoRI helyet deletáljuk. A vektor SacI helyére XbaI kötőhelyet inszertáltunk úgy, hogy a vektort SacI-el emésztettük, T₄ -DNS-polimerázzal kezeltük, alkalikus foszfatázzal defoszforiláltuk és CTCTAGAG szekvenciájú (Biolabs#1032) XbaI-linkerrel ligáltuk. Ezt követően még egy XbaI helyet inszertáltunk úgy, hogy az újonnan előállított vektort HindIII-al emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük, alkalikus foszfatázzal defoszforiláltuk és CTCTAGAG szekvenciájú XbaI-linkerrel (Biolabs #1032) ligáltuk. Ezt a vektort pUC19/X-nek neveztük el.

Annak érdekében, hogy a pHGF-S65T (Clontech) vektorban jelenlevő XbaI helyet megsemmisítsük, a vektort XbaI enzimmel emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük és újraligáltuk, ami a pGFP/0 vektort eredményezte. Utóbbit MluI enzimmel emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük majd BamHI-el emésztettük, ezt követően pedig egy 2,3 kilobázispárból álló fragmenst izoláltunk, mely a GFP gént tartalmazta. A fragmenst a pUC19/X vektor többszörös klónozó helyére inszertáltuk, amelyet SalI enzimmel emésztettünk, Klenow enzimmel kezeltük, majd BamHI enzimmel emésztettük. A keletkezett vektor a pTGF61 nevet kapta.

Az alábbi oligonukleotidokat (Metabion) PRE-S(5'-GGG GTA CCA GCT TCG TAG CTA GAA CAT CAT GTT CTG GGA TAT CAG CTT CGT AGC TAG AAC ATC ATG TTC TGG TAC CCC-3'; 10 azonosítószámú szekvencia) és

PRE-AS(5'-GGG GTA CCA GAA CAT GAT GTT CTA GCT ACG AAG CTG ATA TCC CAG AAC ATG ATG TTC TAG CTA CGA AGC TGG TAC CCC-3'; 11. azonosítószámú szekvencia)

Hibridizáltuk, kinázzal foszforiláltuk, miáltal a PRE(ds) inszertet nyertük.

A pTGF61 vektort Eco109I enzimmel emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük, alkalikus foszfatázzal defoszforiláltuk, majd a PRE(ds) inszerttel ligáltuk, ami a pTGF65 vektort eredményezte.

A pUC19 vektort (MBI Fermentas) SalI-el emésztettük, Klenow enzimmel kezeltük, alkalikus foszfatázzal defoszforiláltuk, majd a GCGCCGCG (Biolabs#1045) szekvenciájú NotI-linkerrel ligáltuk, ami a pUC19/N vektort eredményezte.

A IX faktor cDNS-ét humán májsejt-cDNS-ből (Clontech) amplifikáltuk. Két olyan indítóláncot alkalmaz-

tunk, amely lefedte a IX faktor nyílt leolvasási fázisának start-és stopkodonját. Ennek eredményeképpen 1387 bp-ból álló fragmens keletkezett, mely a teljes leolvasási fázist tartalmazta. A klónozást megkönnyítendő, az indítólánckok végén volt egy EcoRI (leolvasással megegyező) és egy BamHI(leolvasással ellentétes) restrikciós hely. Az amplifikálást Pwo DNS polimerázzal (Boehringer Mannheim) végeztük, 50 µl reakcióterefogatban [10 mM Tris HCl pH 8,85, 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂ SO₄, 2mM MgSO₄], 30 inkubációs cikluson át, 96° C-on 1 percig, 60° C-on 1 percig, 72° C-on 2 percig, majd egy végső kiterjesztési lépés következt, 72° C-on 10 percig.

A reakció termékeit a pUC19 vektor EcoRI és BamHI restrikciós helyeire ligáltuk, majd E. coli DH5-α törzsbe transzformáltuk. A pozitív klónokat szelektáltuk, a szekvenciákat mindkét vég irányából ciklusos szekvenálással (Amersham) igazoltuk, jelölt láncindítókkal (IR-700) és automatikus analízissel a LiCor szekvenáló rendszeren (MWG, Biotech).

Az alábbi láncindítókat alkalmaztuk:

GGAATTCCGCAAAGGTTATGGCAGCGCTGAACATGATCATGGC (leolvasással megegyező irányú; a 16. azonosítószámú szekvencia)

CGCGGATCCATTAAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC (leolvasással ellentétes irányú; a 17. azonosítószámú szekvencia).

A humán cDNS-könyvtárból izolált IX humán véralvadási faktor nyílt leolvasási fázisát tartalmazó, 1,4 kilobázispárból álló fragmensét a fent előállított pUC19/N vektor PstI helyére inszertáltuk, majd a vektort PstI enzimmal emésztettük, T4-polimerázzal kezeltük, és alkalikus foszfátzsal defoszfóriláltuk. Az így keletkezett pUC19/N-FIX vektorból, HindIII és NotI enzimmal végzett kettős emésztéssel kivágtuk a humán IX faktor nyílt leolvasási fázisát tartalmazó, 1,4 kbp-ból álló fragmenst.

Ezt a fragmenst ligáltuk a HindIII és NotI enzimmal kétszeresen emésztett pTGFG5 vektor 4,3 kbp-ból álló fragmenséhez, ami a 3. ábrán bemutatott pTGFG36 vektort eredményezte. Utóbbi előnyösen alkalmazható IX faktort kódoló expressziós kazetta bejuttatására a sejtekbe, és a 6. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be.

3.példa: fehérjét expresszáló humán sejtvonal:

Előnyösen a tsA201 (ECACC Ref:96121229) sejtvonalat alkalmazzuk, mely transzformált humán embrionális-vese-sejtvonal (293, ECACC 8555120602), és stabilan expresszálja az SV40, hőérzékeny T-antigént [J. Membrane Biol. 152., 39. old. (1996); Gene 156., 235. old. (1995); PNAS USA 91, 12785. old. (1994); Pflügers Arch. 427, 136. old. (1994); J. Gen. Physiol. 104, 507. old. (1994); BioTechniques 15, 906. old. (1993). Fenti sejtvonal 293tsA1609neo [Mol. Cell. Biol. 7, 379. old. (1987)] és 293T néven is hozzáférhető. Ezt az epitéliumszerű sejtvonalat egy sor funkcionális expressziós vizsgálatban alkalmazták és úgy találták, hogy nagy mennyiségben termel rekombináns fehérjét. A sejteket 2 mM glutaminnal és 10% FCS-el dúsított DMEM tápközegben tenyésztik. A IX faktor hatékony termelődésének érdekében a tápközeghez 100 µg/ml K vitamint adagolhatunk (4770999. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat).

Annak érdekében, hogy az expresszált polipeptid tisztítását egyszerűbbé tegyük, a sejteket megfelelő kiegészítőket tartalmazó, szérum-vagy fehérjementes közegben tenyésztjük. Stabilitási okokból a VII faktor szekretálása a tápközegben vWF jelenlétében történik (5198349. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat), de leírták lipoproteinek, foszfolipidek, poliglikolok, nyomelemek, heparin, nemionos felületaktív anyagok és ciklodextrin hozzáadását is (EPO254076. európai közzétételi irat, 5679549., 5198349., 5576194., 5378612. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat, EP0872487. európai közzétételi irat, WO1152/94. nemzetközi közzétételi irat).

4. példa: 293T sejtek transzfektálása kalcium-foszfáttal. VIII és IX faktor átmeneti termelése érdekében

Konfluáló 293T sejteket kis sűrűség mellett szélesztünk 10 cm-es csészékben, 6 ml DMEM / 10%FCS (10 µg/ml K vitamin a FIX előállításához) közegébe, a transzekció előtti napon. A transzekciót nagyvonalakban Chen és Okayama által ismertetett eljárás szerint végeztük [Mol. Cell. Biol. 7,2745. old.(1987)]. A VIII faktor előállításához 12 µg pTGF8-1 plazmidot, a IX faktor előállításához ugyanannyi, pTGF8-3 plazmidot transzfektáltunk. 6 órával a transzekció után az elhasználandó tápközeget frissre cseréltük és a felüliszót a transzekciót követő 3. napon összegyűjtöttük és továbbtisztítottuk vagy további tisztítás nélkül ELISA-vagy koagulometriás vizsgálatnak vetettük alá (ld. az 5. és 6. példákat).

5. példa: FIX és FVIII koncentrációjának meghatározása ELISA-val

IX faktor: A humán rekombináns IX faktor-szinteket a transzfektált 293T sejtek felüliszójában, ELISA-val mértük. Befogó ellenanyagként kecske-anti-humán-IX faktor-poliklonális ellenanyagot alkalmaztunk (Enzyme Research Laboratories). Valamennyi inkubáció párasított kamrában, 2 órán keresztül, 22°C-on történt. A lemezeket (Dynex, Immulon-4) 100 µl-nyi, 8,8 µg/ml antitestet tartalmazó bevonópufferrel vontuk be. Az ismertetett körülmények mellett blokkolásra nincs szükség, a lemez négyszeri mosása (Encore 2000, Merck) 0,1% v/v PBS-Tween oldattal elegendő a nonspecifikus kölcsönhatások blokkolásához.

Az egyes lépéseket követően a meg nem kötött fehérjéket mosással távolítottuk el. Mindegyik mérőhelyhez 10 µl 10 mM PSMF-et és 10 µl 0,11 M nátrium-citrátot adtunk. A minták és a standard (human factor IX, house standard, Octapharma) hígításait dilúciós pufferrel (HBS-BSA-EDTA-Tween®) végeztük, majd mérőhelyenként 100 µl-nyi térfogatban inkubáltuk. Detektáló antitestként peroxidázal jelölt kecske-anti-FIX poliklonális antitestet alkalmaztunk (Enzyme Research Laboratories), 1 µg antitest/ml dilúciós puffer koncentrációban, majd inkubáltuk, mérőhelyenként 100 µl-nyi térfogatban. Szubsztrátumként mindegyik mérőhelyhez 150 µl ABTS-t (Roche) adtunk, és 1-2 óra múlva 405 nm hullámhossznál olvastuk le a kolorimetriás reakció eredményét. Az eredményeket a standard koncentrációk függvényében mért abszorbancia lineáris regressziójával számítottuk ki, és az alábbi táblázatban összegeztük:

Sejtszám(/ml)	FIX-koncentráció (ng/ml)	Alvadási idő (s)
$2,1 \times 10^5$	36	45
$8,7 \times 10^5$	20	79

Normál plazma: 37-39 s

FIX-hiányos plazma: 137-140 s

VIII faktor: a humán rekombináns VIII faktor-szinteket a transzfektált 293T sejtek tápközegében ELISA-val határoztuk meg, befogó antitestként affinitás-tisztított poliklonális bárány-anti-FVIII:C-készítményt (F8C-EIA-C, Affinity Biologicals) alkalmaztunk. A lemezek bevonása 2 órán át, 22°C-on, párasított kamrában történt. A lemezeket (Dynex, Immulon-4) 100 µl-nyi, 100-szoros hígítású antitestet tartalmazó bevonó pufferrel (50 mM 9,6-os pH-jú nátrium-karbonát) vontuk be. A lemezek négyszeri mosása (Encore 2000, Merck) megfelelően blokkolta a nonspecifikus kölcsönhatásokat.

Az egyes lépéseket követően a meg nem kötött fehérjéket mosással távolítottuk el. 48 óra inkubálás után mindegyik mérőhelyhez 100 µl-nyit adtunk valamennyi tápközeg-mintából, amelyeket a különböző, pTGF8-3

plazmával stabilan transzfektált, 293T klónokból nyertünk. A standard FVIII hígításokat (house standard, Octopharma) dilúciós pufferrel (HBS-BSA-EDTA-Tween®) végeztük, és mérőhelyenként 100 µl-nyi térfogatban inkubáltuk. A detektálást peroxidázzal jelölt poliklonális anti-VIII (F8C-EIA-D, Affinity Biologicals) ellenanyag előregyártott hígításával végeztük, amit mérőhelyenként 100 µl-nyi térfogatban 60 percre inkubáltunk. A kolorimetriás reakcióhoz 5 mg O-feniléndiamin-tablettát (P-6912, Sigma) kis idővel az alkalmazás előtt 12 ml pufferszubsztrátban oldottunk fel, majd kiegészítettük 12 µl 30%-os hidrogénperoxiddal. Az oldathól 150 µl-nyit adtunk valamennyi mérőhelyhez, sötétben 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a reakciót 50 µl 2,5M kénsav hozzáadásával valamennyi mérőhelyen leállítottuk.

Ezután elvégeztük a kolorimetriás leolvasást *MRX Reader*-el (Dynex), 490 nm hullámhosszon. Az eredményeket a standard koncentrációk függvényében mért abszorbancia lineáris regressziójával számítottuk ki (7A ábra) és a 7B ábrán ismertetjük.

6. példa: a humán VIII és IX alvadási faktor aktivitásának detektálása:

A humán rekombináns VIII faktor alvadási aktivitását a 293T sejtek tenyésztésének felülszójából (a sejteket kalcium-foszfátos precipitálással, pTGF8-1 plazmával transzfektáltuk a 4. példában ismertetett módon) a következőképpen történt:

Az alvadási aktivitás vizsgálata parciális tromboplasztin időt vizsgáló eljárás alapján, melynek során manuális alvadási eszköz (ML-2, Instrumentation Laboratories) alkalmazásával cefalint (foszfatidil-etanolamin) aktiváltunk. Tanulmányozás céljából 100 µl hígítatlan felülszót a transzfektált 293T sejtek közegéből, 100 µl faktorhiányos plazmát (Progen) és 100 µl cefalint (Instrumentation Laboratories) 5 percre 37°C-on inkubáltunk. Az alvadás folyamatát 100 µl CaCl₂ hozzáadásával indítottuk el, majd összehasonlítottuk a minta alvadási idejét a normál plazmáéval. Az eredményeket az 5.B ábrán összesítjük. Látható, hogy a felülszó sejtei (a pTGF8-1 plazmával transzfektált sejtekből) a normál plazmához hasonló alvadási aktivitással rendelkeztek, míg a nem transzfektált sejtekre olyan értéket kaptunk, mely megfelel a VIII faktor-hiányos plazmáénak.

A IX faktor alvadási aktivitását hasonló vizsgálattal határoztuk meg, az eredményeket az 5. példa táblázatában mutatjuk be. A 10. ábrán az expressziót ábrázoljuk a K vitamin jelenlétének függvényében.

7. példa: vírus-inaktiváció

A vírus-inaktivációt a 6007979. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat alapján végeztük, mely szerint potenciálisan fertőző fehérjeoldathoz keveréssel az alábbi hatóanyagokat adtuk:

1. 0,2 ml Tween® 80-at és 0,06 ml TNBP-t 19,74 ml-nyi oldathoz, vagy
2. 0,2 ml Triton® X-100-at és 0,2 ml TNBP-t 19,6 ml-nyi oldathoz

Az 1. és 2. készítményekhez 1 ml ricinusolajat adtunk, majd 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten intenzíven extraháltuk.

Fázisszeparáció végett mindkét készítményt centrifugáltuk. A fertőző jelleg vizsgálatára a vizes fázisból több soron 1 ml-es mintákat vettünk.

8. példa: VIII és IX faktort stabilan expresszáló sejtvonalak létrehozása: előnyösen a pTGF8-1 és pTGF36 vektorokat alkalmazzuk, melyek sorrendben a VIII és IX faktor emlőssejtekbe történő expressziójára alkalmas konstrukciókat tartalmaznak. Annak érdekében, hogy stabilan transzfektált sejtklón szelekcióját lehetővé tegyünk, higromicin-B-foszfotranszferázt (a TK-hyg, Clontech HindIII-Mva 1260I fragmentuma) szubklónoztuk az SmaI-es helyre, mely mindkét vektorban megtalálható. Az így előállított konstrukciók (pTGF8-1-hyg és pTGF36hyg) cisz helyzetben tartalmazzák a humán VIII vagy IX faktort kódoló expressziós

kazettákat, valamint egy CMV-promóterrel és SV40 poliadenilációs szignállal együtt, és a higromicin-B-foszfotranszferáz expressziós kazettát, HSV timidinkináz-promóterrel és HSV timidinkináz-poliadenilációs szignállal együtt (ld. 4. ábra).

A pTGF8-2hyg-s és pTGF8-3 vektor (6. ábra, a 12. és 14. azonosítószámú szekvencia) a pTGF8-1hyg származéka, amelyben a V162A, S2011N, V2223E (pTGF8-2hyg-s) és S2011N (pTGF8-3) pontmutációkat vad típusú szekvenciára revertáltuk PCR-dependens eljárással, a *QuickChange*® protokollt (Stratagene) alkalmazva.

A véralvadási faktorokat kódoló szekvencia bármely más, választott génsekvenciával helyettesíthető. Ezek a konstrukciók lehetővé teszik stabilan expresszáló sejtvonalak előállítását kalciumfoszfátos transzfekcióval és ezt követő szelekcióval a higromicin-rezisztenciára. Ráadásul a plazmidok progeszteronra érzékeny elemet(PRE) is tartalmaznak. A pTG36hyg vektorral végzett transziens transzfekciós kísérletek során a tenyésztő közegben milliliterenként kb. 40 ng aktív IX faktor termelődött, mely ELISA-és koagulometrikus vizsgálattal kimutatható volt (ld. 5. és 6. példa).

IX faktor előállítása érdekében 293T sejteket DMEM közegében tenyésztettünk, melyet 10% FCS-ei és 10 µg/ml K vitamin hozzáadásával egészítettünk ki (477000999. Amerikai Egyesült államokbeli szabadalmi irat; ld. a 10. ábrát is). Először meg kellett találnunk azt a kritikus antibiotikum-koncentrációt, amelyenél a stabilan transzfektált 293T sejtek hatékony szelekciója végbemegy. E célból a sejteket kis hígításban szélesztettük és 10-800 µg/ml higromicin-B jelenlétében tenyésztettük. Két hét múlva azt találtuk, hogy 200 µg/ml-es, vagy ennél magasabb antibiotikum-koncentráció mellett nincs sejtnövekedés, ezért ezt a koncentrációt választottuk stabilan transzfektált sejtek szelekciójához.

Típusos transzfekciót 10 cm-es csészékben, 293T sejtekkel végeztünk, amelyeket előző nap 1:15 arányban szétosztottunk. Kalciumfoszfát-precipitációs módszerrel [Biotechniques 6-7, 632-638. old. (1998)] csészénként 12 µg plazmidot transzfektáltunk, 2 nap múlva a tápközeget frissre cseréltük, mely 200 µg/ml higromicin-B-t tartalmazott. 2-3 hét szelekciót követően a közeget, VIII vagy IX faktor kimutatása végett, ELISA-val teszteltük (ld. 5. példa). A pozitív klónokat izoláltuk és 24 mérőhelyes lemezre vittük.

ELISA vizsgálatot és aktivitás-meghatározást követően a pozitív klónokat még kétszer szubklónoztuk, majd felszaporítottuk és alikvotnyi mennyiségeiket lefagyasztottuk, további alkalmazás és jellemzés céljából.

9. példa: a stabilan transzfektált sejtek fenotípus-azonosságának bizonyítása a VIII faktor expressziójának *in situ* immunofluoreszcenciás detektálásával: a pTGF8-3 plazmiddal(49/19. klón) stabilan transzfektált 293T sejteket és a nem transzfektált 293T sejteket (negatív kontroll) az adhézión tenyésztetkekből, melyek a DMEM + 9,1% FBS tápközegében tenyésztettek, tripszinizációval leválasztottuk a tenyésztőedényekről, néhányszor mostuk és 5 ml PBS pufferben reszuszpendáltuk.

A sejtuszuspenziókból 2 µl-nyit steril mikroszkópos tárgylemezre tettünk és szobahőmérsékleten inkubáltuk, amíg a folyadék teljesen elpárolgott. A sejteket 10 percig 70%-os etilalkoholban fixáltuk és 5 percig szobahőmérsékleten szárítottuk. A tárgylemezeket nonspecifikus detektálás ellen blokkoltuk úgy, hogy 10% FBS-t tartalmazó PBS pufferben inkubáltuk. Az első antitestet (sh antiFVIII:C F8C-EIA-C, Affinity Biologicals) 10% FBS-t és 0,1% szaponint tartalmazó PBS pufferrel százszorosára hígítottuk és 60 percig, párasított kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Intenzív mosást követően (PBS-el) elkészítettük a második antitest (rb anti sh CY3 konjugátum 313-163-003, Jackson ImmunoResearch) százszoros hígítását, majd a fent ismertetett módon inkubáltuk. Ezt követően a mikroszkópos preparátumot intenzíven mostuk, majd 50%-os glicerinréteggel és fedőlemezrel fedtük le. A sejteket fehér fény- és fluoreszcencia-mikroszkópiával tettük láthatóvá

(emisszió 570 nm-en). Az eredményeket a 8. ábrán mutatjuk be.

10. példa: a rekombináns IX faktor hőstabilitásának vizsgálata a tenyészet szűrlésében:

A sejtenyészetet 2 nappal a 293T sejtek transziens transzfekciója után gyűjtöttük össze (a transzfekció pTGFG36 plazmával, K. vitamin jelenlétében történt), -80°C-on tároltuk 7 napig, majd gyorsan felolvasztottuk, 7 db., 500 µl-es alikvotba osztottuk, melyeket ezt követően az alábbi hőmérsékleti értékek mellett inkubáltunk:

Minta	Hőm(°C)	Idő(min)
1	0	240
2	20	30
3	20	60
4	20	240
5	37	30
6	37	60
7	37	240

A mintákat jégen lehűtöttük és az FIX aktivitást a 6. példában leírtak szerint határoztuk meg. Az eredményeket a 9. ábrán ismertetjük. 4 órán keresztül, 37°C-on az aktivitás csaknem változatlan maradt.

MEGADÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

Számadalmi igénypontok

16317
P0300508

1. VIII. faktor mutein, amelyben a 740. Arg és 1649. Glu közötti B-domén helyettesítve lett argininban gazdag kapcsolópeptiddel, amelyben legalább 3 Arg-oldallánc van és 10-25 aminosav-oldalláncot tartalmaz, ahol a VIII. faktor számozása az érett vad típusú VIII. faktor 2. azonosítószámával jelzett szekvenciájához van viszonyítva.

2. Az 1. igénypont szerinti VIII. faktor mutein, amely az alábbi mutációk közül legalább egyet tartalmaz:

(a) a 162. valin helyettesítése semleges aminosav-oldallánccal, amely Gly, Ala, Leu, Ile, Met vagy Pro oldallánc bármelyike;

(b) a 2011. szerin helyettesítése hidrófil aminosav-oldallánccal, amely Asn, Thr vagy Glu oldallánc bármelyike; és

(c) a 2223. valin helyettesítése savas aminosav-oldallánccal, amely Glu vagy Asp oldallánc.

3. A 2. igénypont szerinti VIII. faktor mutein, amelyben legalább egy mutáció van az (a) és (b) pontokban ismertetett mutációk közül.

4. A 2. igénypont szerinti VIII. faktor mutein, amely az (a), (b) és (c) pontokban ismertetett mindhárom mutációt tartalmazza.

5. A 2-4. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor mutein, amelyben az (a) pontban felsorolt mutációk közül a 162. valin alaninnal, a (b) pontban felsorolt mutációk közül a 2011. szerin aszparaginnal és/vagy a (c) pontban ismertetett mutációk közül a 2223. valin glutaminnal lett helyettesítve.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor mutein, amelyben az argininban gazdag kapcsolópeptid 14-20 aminosav-oldalláncot tartalmaz.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor mutein, ahol a kapcsolópeptid a következő aminosav-szekvenciákat tartalmazza:

az SFSQNSRH aminosav-szekvenciát és/vagy

a QAYRYRRG aminosav-szekvenciát.

8. A 7. igénypont szerinti VIII. faktor mutein, ahol a kapcsolópeptid szekvenciája SFSQNSRHQAYRYRRG.

9. Az 1. igénypont szerinti VIII. faktor mutein, amely a 4., 13. vagy 15. azonosítószámú szekvencia 1-1440. aminosavait tartalmazza.

10. DNS-szekvencia, amely az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktort muteint kódolja.

11. A 10. igénypont szerinti DNS-szekvencia, amely legalább egyet tartalmaz az alábbi mutációk közül: T485C, G6032A vagy T6668A, amelyek az érett, vad típusú VIII. faktor 1. azonosítószámú DNS szekvenciájához vannak viszonyítva; előnyösen a DNS szekvencia mindhárom mutációt tartalmazza.

12. Vektor, amely a 10. vagy 11. igénypont szerinti DNS-szekvenciát tartalmazza.

13. A 12. igénypont szerinti vektor, amely sorrendben a 3., 12. és 14. azonosítószámú szekvencián bemutatott pTGF8-1, pTGT8-2hyg-s vagy pTGF8-3.

14. A 12. igénypont szerinti vektor, amely géntranszfer-vektor.

15. Izolált gazdasejt, amely 12. igénypont szerinti vektorral van transzformálva és/vagy 10. igénypont szerinti DNS-szekvenciát tartalmaz.

16. Eljárás az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor mutein előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

- (a) 15. igénypont szerinti transzformált gazdasejtet tenyésztünk; és
(b) a tápközegből a VIII. faktor muteint izoláljuk.
17. Gyógyászati készítmény, amely az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor muteint, vagy a 14. igénypont szerinti géntranszfer-vektort tartalmazza.
18. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor mutein vagy a 14. igénypont szerinti géntranszfer-vektor alkalmazása hemofília, előnyösen A-hemofília kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.
19. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (a) lépésben immortalizált humán sejtvonalat tenyésztünk, amely Simian vírus T-antigént stabilan expresszál és olyan vektort hordoz, amelynek promótere működőképesen kapcsolódik a VIII. faktor muteint kódoló DNS-szekvenciához.
20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immortalizált humán sejtvonalként immortalizált vese, hólyag, máj, tüdő, szívizom, simaizom, petefészek vagy gasztrointesztinális sejtet alkalmazunk.
21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immortalizált humán sejtvonalként humán vese-sejtből származó, előnyösen 293T (DSM ACC2494) sejtvonalat alkalmazunk.
22. A 19-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szelekciós markert és/vagy regulátor-szekvenciákat is tartalmazó vektort alkalmazunk.
23. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdasejtként immortalizált vese, hólyag, máj, tüdő, szívizom, simaizom, petefészek vagy gasztrointesztinális sejtet, előnyösen humán vesesejtből származó sejtet alkalmazunk.
24. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immortalizált sejtvonalként legalább egy vírus-transzkripciót aktiváló fehérjét, mint például az E1A vagy E1B adenovírus fehérje, a bovin papillomavírus korai régiójának DNS szekvenciája által kódolt fehérje és herpeszvírus IE fehérje által alkotott csoportból kiválasztott aktivátor fehérjét expresszáló sejtvonalat alkalmazunk.
25. A 19-24. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tenyésztést von Willebrand faktor (vWF) jelenlétében végezzük.
26. A 16. és 19-25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy továbbá:
(c) tisztítjuk a (b) pontban izolált véralvadási faktort és/vagy
(d) vírus-inaktivációs kezelésnek vetjük alá a (b) pontban izolált, vagy a (c) pontban tisztított véralvadási faktort.
27. Immortalizált humán sejtvonal, amely stabilan expresszál legalább egy, vírus-transzkripciót aktiváló fehérjét, és 19-21. igénypontok bármelyike szerinti VIII. faktor muteint kódoló vektort hordoz.
28. A 19-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban definiált immortalizált humán sejtvonal, amely stabilan expresszál legalább egy vírus-transzkripciót aktiváló fehérjét, és amely 1-9. igénypontok bármelyike szerint definiált VIII. faktor muteint kódoló vektort hordoz.

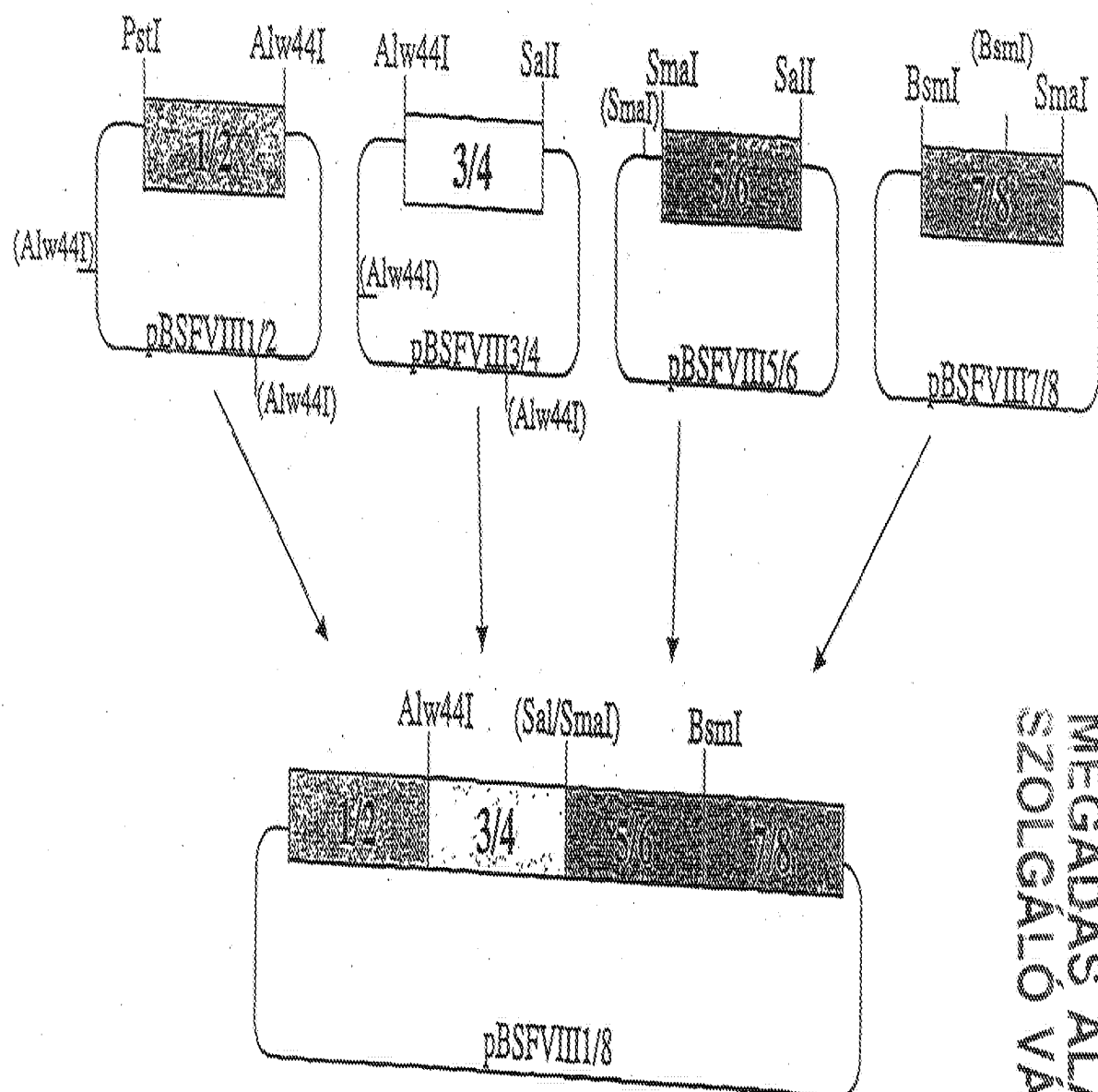
A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.

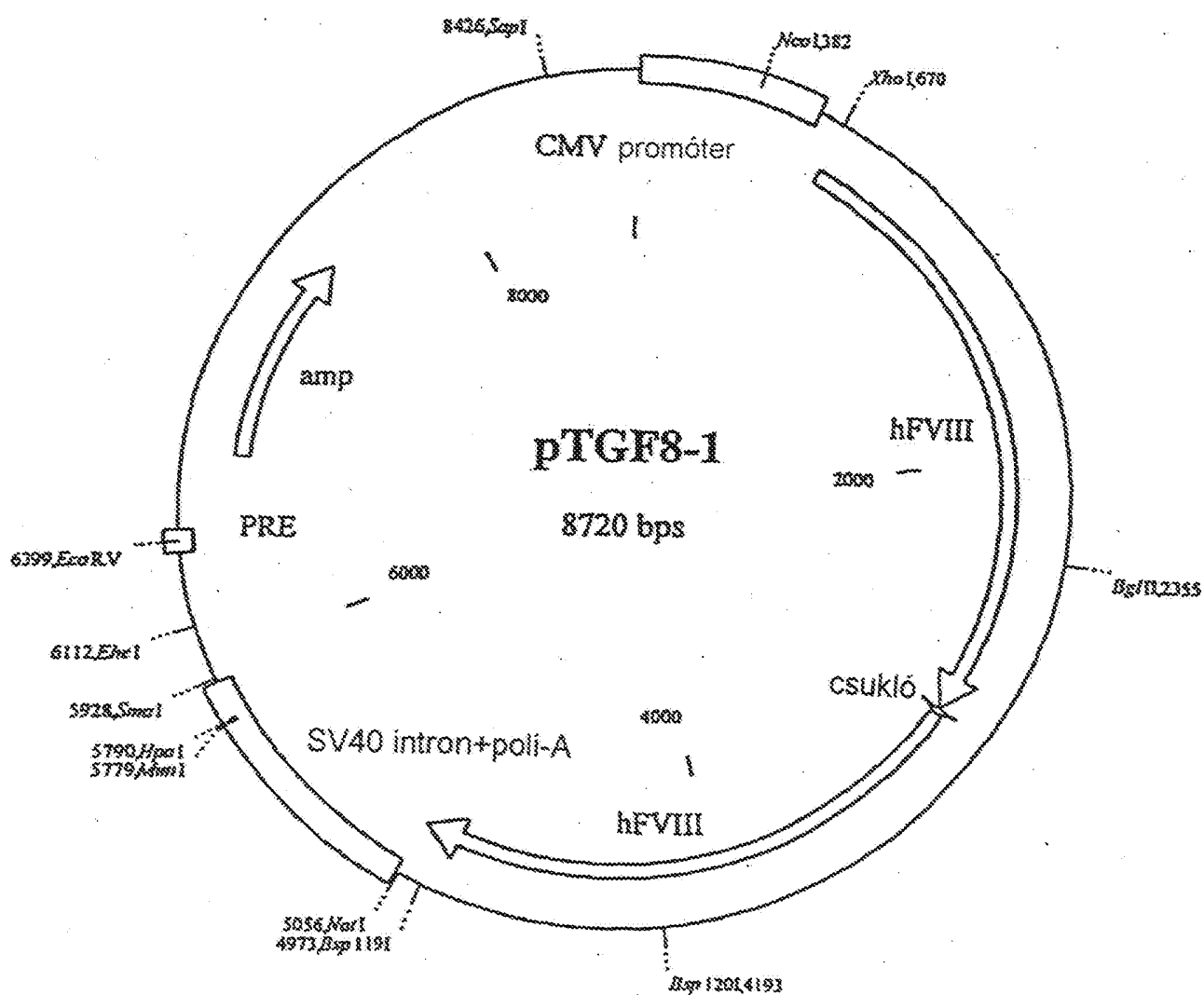
Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivő

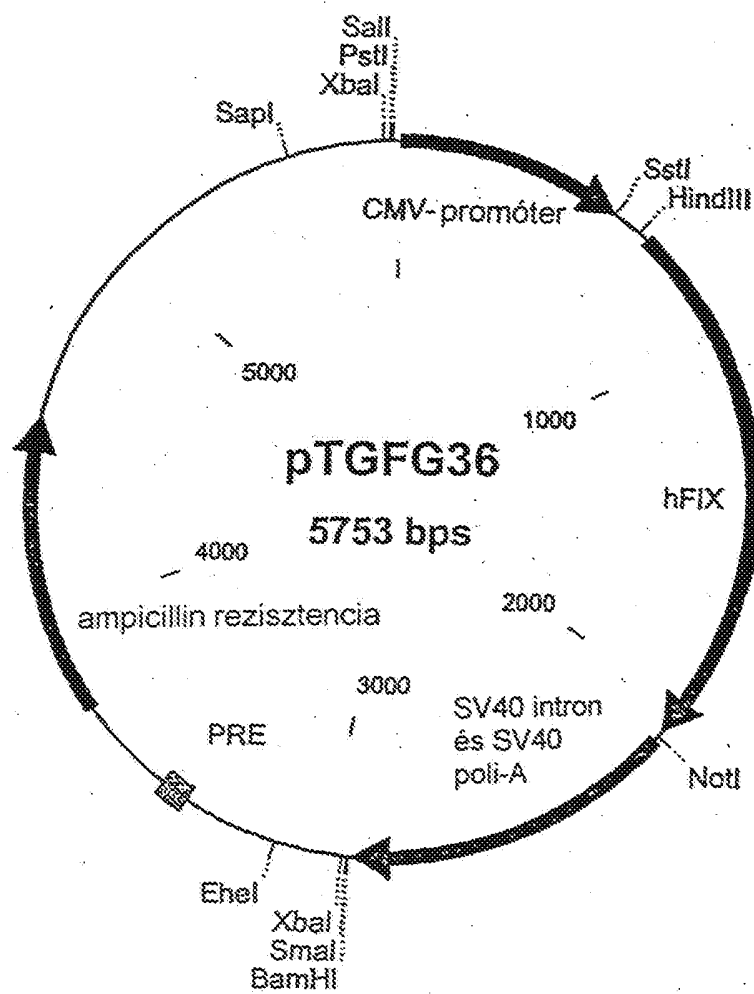


1. ábra

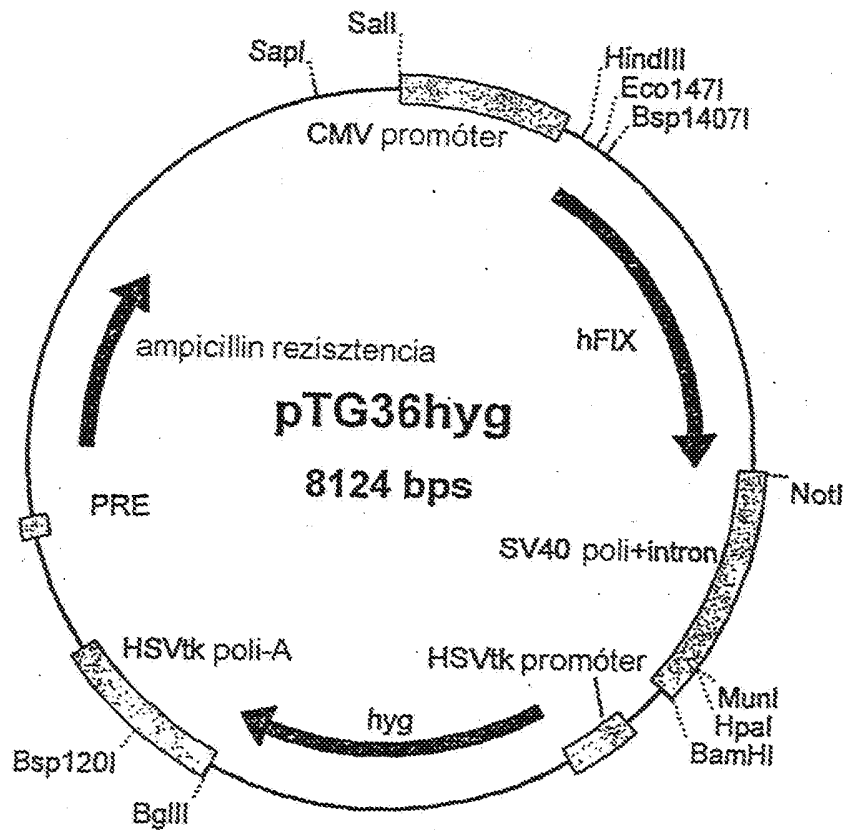
MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT



2. ábra



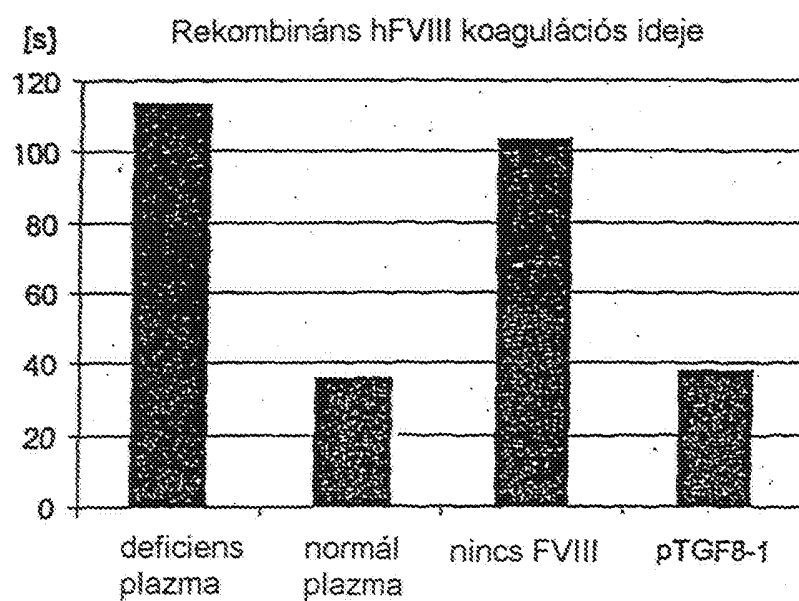
3. ábra



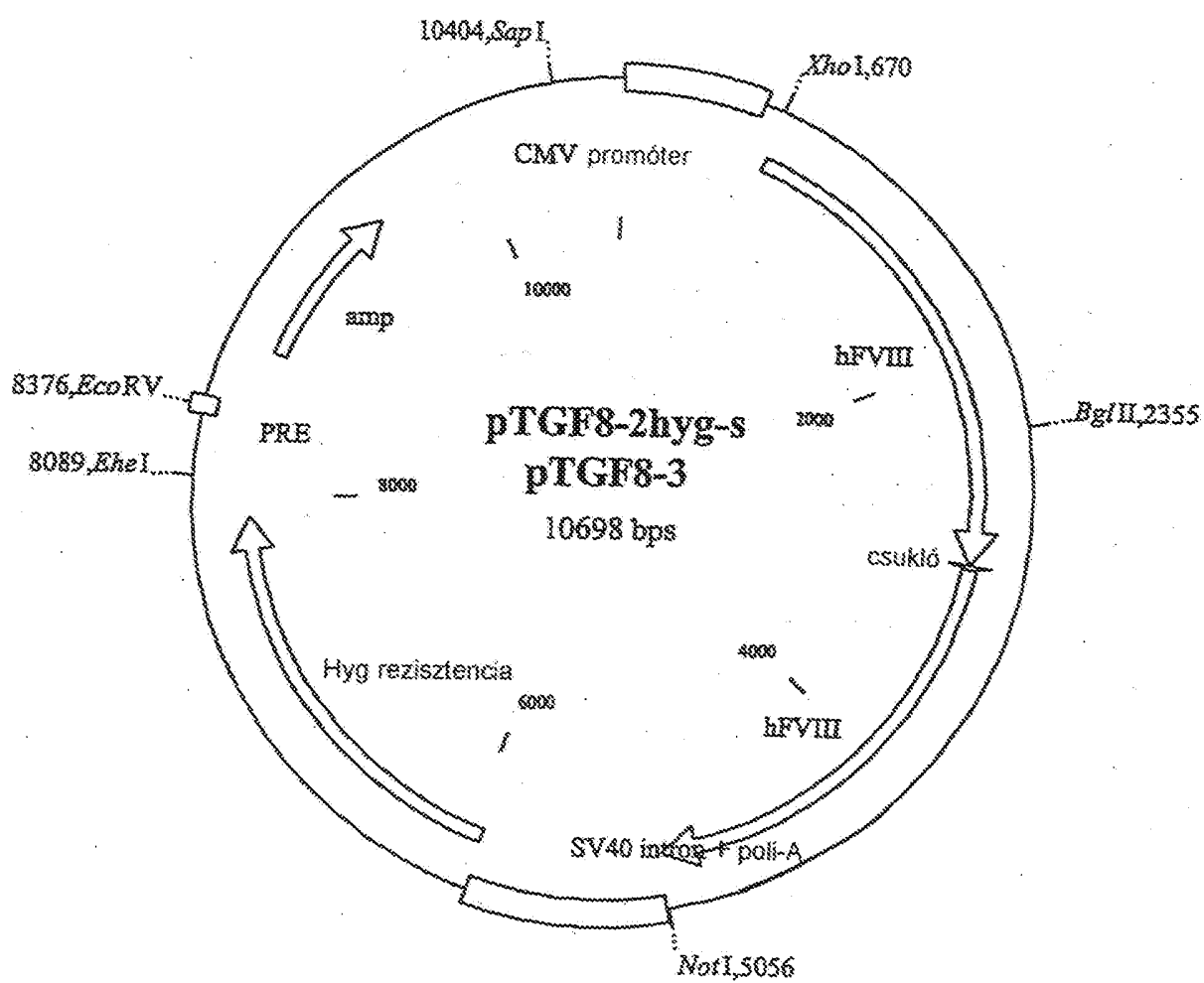
4. ábra

aga| agc ttc tcc cag aat tca aga cat caa gct tat oga tac cgt oga ggg gaa
R740 S F S Q N S R H Q A Y R Y R R G E1649
wt-B-domén variábilis domén

5A ábra



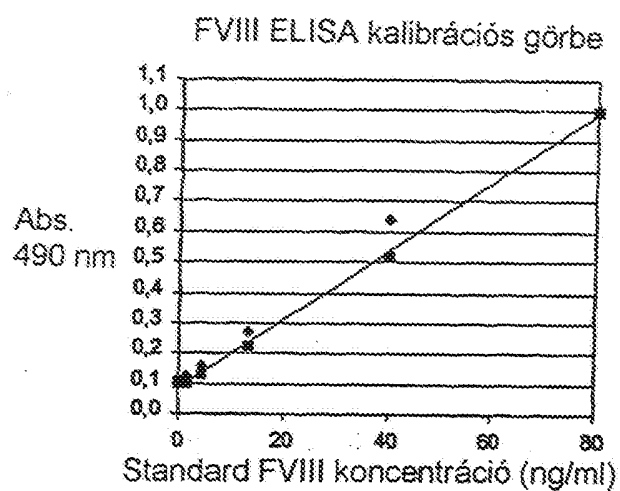
5B ábra



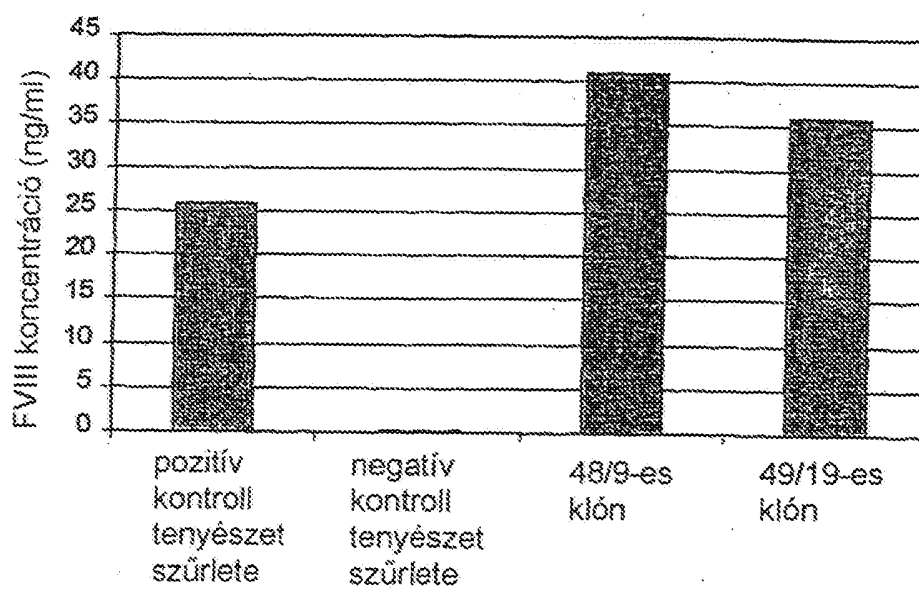
6. ábra

PCT/EP01/03220

7/10

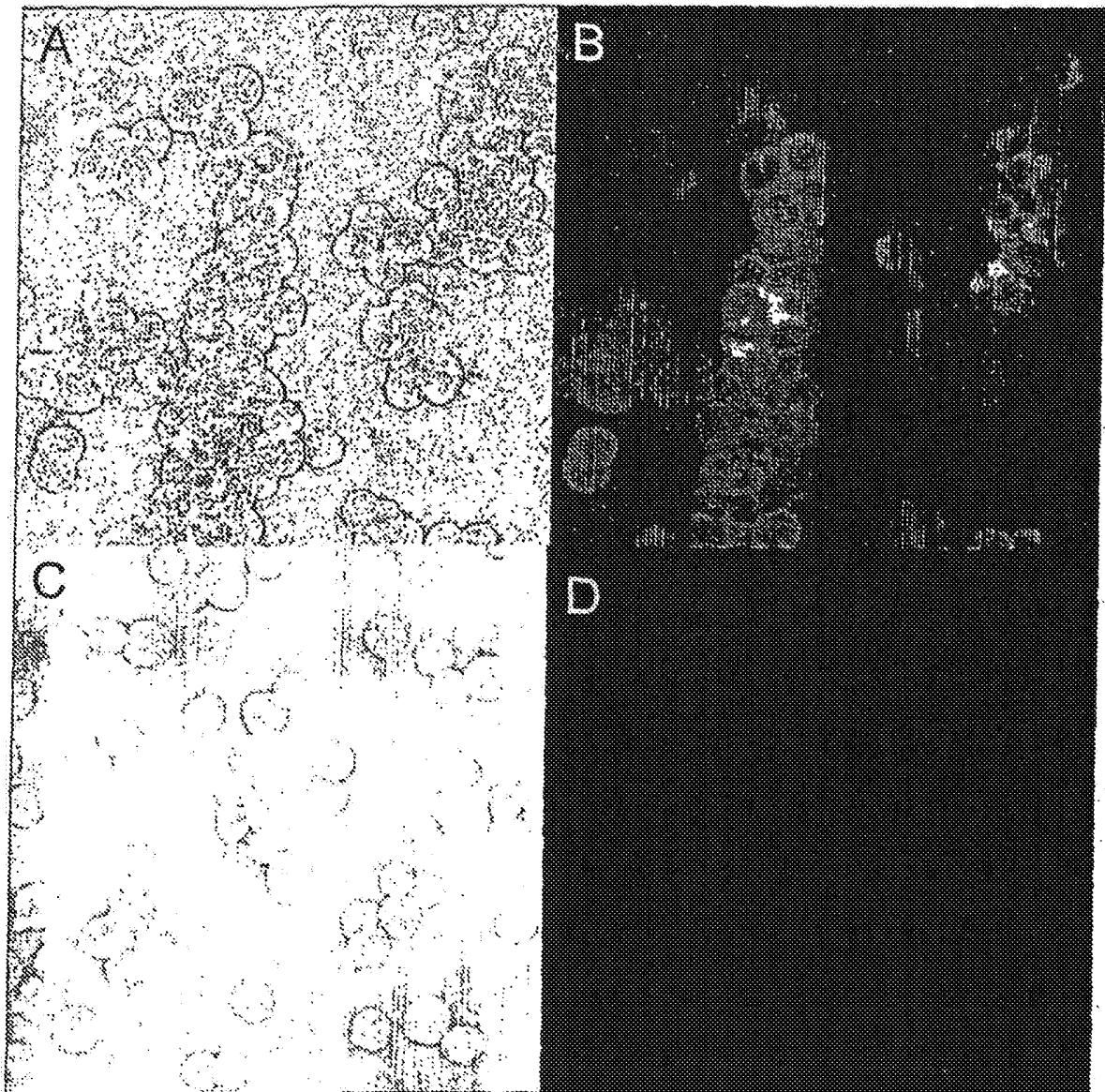


7A ábra

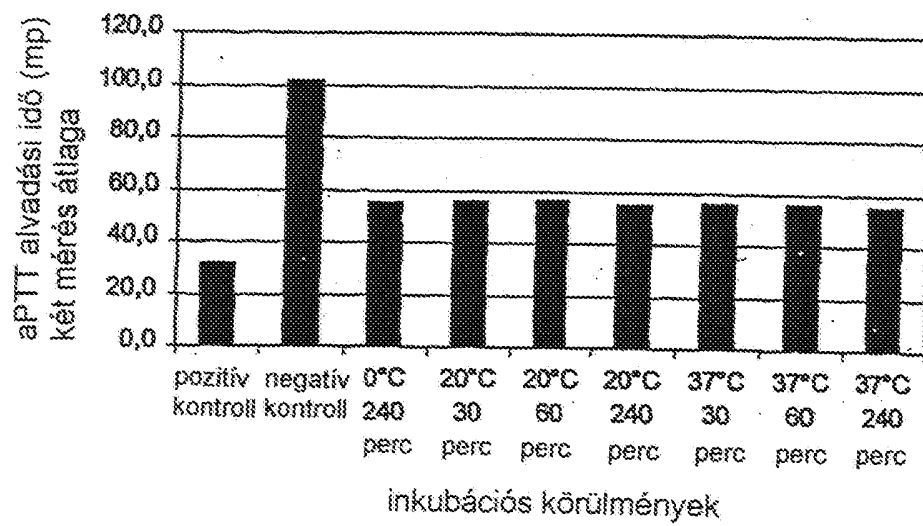


7B ábra

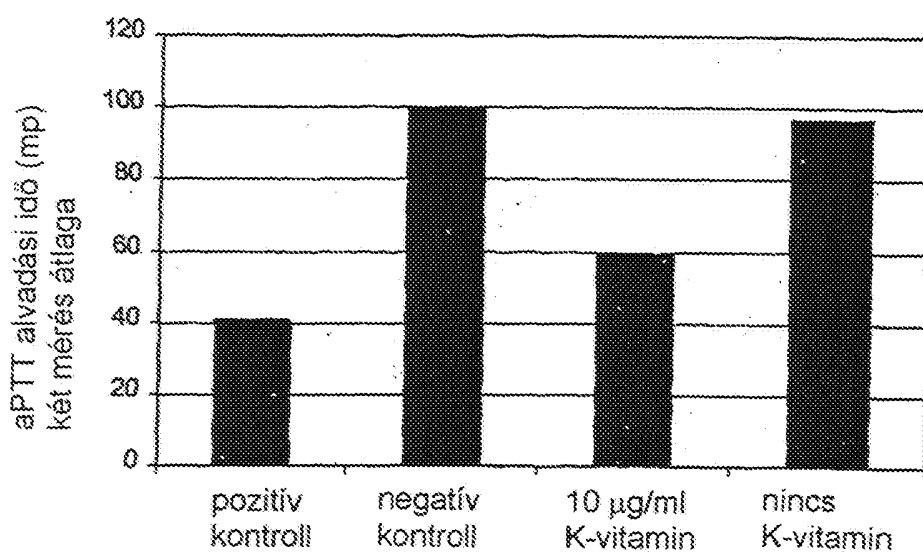
PCT/EP01/03220



8. ábra



9. ábra



10. ábra