



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 269 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/86
C 12 N 15/63
C 12 N 15/67

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 320 252 5	(22)	29.09.88	(44)	13.02.92
(71)	siehe (73)				
(72)	Strauss, Michael, Dr. rer. nat.; Lieber, Andre, Dipl.-Med.; Kiessling, Udo, Dr. rer. nat. Dipl.-Med.; Platzer, Mathias, Dr. rer. nat. Dipl.-Med.; Wählte, Helga, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin, DE				
(74)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen in tierischen Zellen				

(55) Fremdproteine; Zellen, tierische; Helferzellen; Genkopiezahl, maximale; Promotoren, heterologe; Polymerase, prokaryotische; Induktion; Vektorreplikation

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen in tierischen Zellen. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die biotechnologische Produktion von Wirkstoffen und Vakzinen. Es werden Helferzellen für die Erreichung einer maximalen Genkopiezahl sowie zur effektiven Expression heterologer Promotoren mit einer prokaryotischen Polymerase hergestellt. Dieses doppelte Helferzellensystem mit einem Überschuß an RNA-Polymerase und regulierbarer Kopiezahl des Fremdgens unter Kontrolle eines prokaryotischen Promoters gestattet die maximale Synthese eines Fremdgenprodukts in permanenten Zellen. Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die prokaryotische Polymerase im Zellkern der Wirtszelle wahlweise durch Induktion der Vektorreplikation mit Genkopien gesättigt wird und durch Rücknahme der Induktion eine Erholung der Zellen gewährleistet ist. Dadurch kann für jedes Genprodukt ein optimales Langzeit-Produktionsschema individuell festgelegt werden.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen in tierischen Zellen, **gekennzeichnet dadurch**, daß man eine Rekombinante, die ein die Vektorreplikation stimulierendes virales Gen (Replikationsgen) unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors enthält, mittels Transfektion in tierische Zellen einbringt, die Zellklone mit möglichst großer Differenz zwischen nichtinduziertem und induziertem Replikationsgenprodukt selektiert, in einen ausgewählten Klon eine Rekombinante transfiziert, die ein mit einem tierischen Kernlokalisierungssignal modifiziertes prokaryotisches RNA-Polymerase-Gen, das an einen tierischen Promotor gekoppelt ist, enthält, einen Zellklon mit kernlokalisierter RNA-Polymerase selektiert, nachfolgend in diesen Zellklon einen Expressionsvektor einbringt, der eine virale Replikationsstartsequenz, ein Selektionsgen, einen zur RNA-Polymerase homologen prokaryotischen Promotor und unter Kontrolle dieses Promotors das für das entsprechende Fremdprotein kodierende Gen trägt, den Zellklon mit der höchsten Fremdproteinsynthese auswählt und unter Zugabe eines Induktors fermentiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Replikationsgen ein T-Antigen-Gen von Papovaviren verwendet wird und der Expressionsvektor die Replikationsstartsequenz eines Papovavirus trägt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Replikationsgen das Groß-T-Antigen-Gen von Polyomavirus verwendet wird und der Expressionsvektor die Replikationsstartsequenz des Polyomavirus trägt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als regulierbarer Promotor ein Glukokortikosteroid-stimulierbarer Promotor verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß als regulierbarer Promotor der des Maus-Mamma-Tumorvirus (MMTV-Promotor) verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 3 und 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Rekombinante mit Replikationsgen und regulierbarem Promotor das Plasmid pLT2-MMTV2 eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Transfektion der Rekombinante mit Replikationsgen und regulierbarem Promotor in tierischen Zellen in an sich bekannter Weise zusammen mit einem Selektionsgen durchgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Selektionsgen das Metallothionein-Gen verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als prokaryotisches RNA-Polymerase-Gen ein Phagen-RNA-Polymerase-Gen verwendet wird und der Expressionsvektor den entsprechend homologen prokaryotischen Promotor trägt.
10. Verfahren nach Anspruch 1 und 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß als prokaryotisches RNA-Polymerase-Gen das des Bakteriophagen T7 verwendet wird und der Expressionsvektor einen Promotor des Bakteriophagen T7 trägt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als tierischer Promotor der Metallothionein-Promotor der Maus verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als tierisches Kernlokalisierungssignal ein synthetisches Kernlokalisierungssignal, das vom Groß-T-Antigen des Virus SV40 abgeleitet ist, verwendet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1 und 9–12, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Rekombinante mit modifiziertem prokaryotischem RNA-Polymerase-Gen und tierischem Promotor die Rekombinante pMTT7N (Abb. 1) eingesetzt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 12 und 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Rekombinante pMTT7N hergestellt wird durch Substitution des kleinen BglII/SmaI-Fragments des Plasmids pMK-deltaPvu mit dem kompletten T7-Polymerase-Gen, Herausspaltung des BglII/NruI-Fragments des Polymerase-Gens und Einbau an die Stelle des herausgespalteten Fragments des synthetischen Kernlokalisierungssignals mit BglII/NruI-kompatiblen Enden.
15. Verfahren nach Anspruch 12 und 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß als synthetisches Kernlokalisierungssignal eine Nukleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz Met-Asp-Lys-Val-Phe-Arg-Asn-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Arg-Leu-Asp kodiert, eingesetzt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 1 und 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Rekombinante mit modifiziertem prokaryotischem RNA-Polymerase-Gen und tierischem Promotor in einen Zellklon mit möglichst großer Differenz zwischen nichtinduzierter und induzierter Replikationsgen-Expression in an sich bekannter Weise zusammen mit einem anderen Selektionsgen als in den Ansprüchen 7 und 8 transfiziert wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Selektionsgen das Hygromycinresistenzgen verwendet wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Auswahl der Zellklone mit kernlokalisierter RNA-Polymerase mittels Immunfluoreszenz und Polymerasetest durchgeführt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Expressionsvektor einen natürlichen oder synthetischen zur RNA-Polymerase homologen prokaryotischen Promotor trägt.
20. Verfahren nach Anspruch 1, 3, 10 und 19, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Expressionsvektor ein Plasmid hergestellt wird, das die Replikationsstartsequenz des Polyomavirus, einen synthetischen T7-Phagen-Promotor und als Selektionsgen das neo-Gen trägt.
21. Verfahren nach Anspruch 1, 9, 19 und 20, **gekennzeichnet dadurch**, daß das für das entsprechende Fremdprotein kodierende Gen in den Expressionsvektor in einen Polylinker in Leserichtung hinter den Promotor kloniert wird.
22. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Transfektion des Expressionsvektors in die Zellklone mit Replikationsgen und kernlokalisierter RNA-Polymerase in an sich bekannter Weise durchgeführt und auf Vorhandensein des neo-Gens selektiert wird.
23. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Induktor zur Stimulierung der Vektorreplikation dem Medium Glukokortikosteroide zugesetzt werden.
24. Verfahren nach Anspruch 1, 5 und 23, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Induktor 10^{-8} bis 10^{-6} M Dexamethason zugesetzt werden.
25. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als tierische Zellen Zelllinien oder Primärzellen beliebiger Spezies oder Organherkunft verwendet werden.
26. Verfahren nach Anspruch 1, 3 und 25, **gekennzeichnet dadurch**, daß als tierische Zellen Zelllinien oder Primärzellen von Nagetieren eingesetzt werden.
27. Verfahren nach Anspruch 1 und 21, **gekennzeichnet dadurch**, daß in den Expressionsvektor als Fremdgen ein Wirkstoffgen wie dasjenige für Wachstumshormon, Gewebeplasminogenaktivator, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Erythropoitin oder ein virales Antigen-Gen wie diejenigen des Hepatitis B-Virus, Influenza-Virus, AIDS-Virus, Maul- und Klauen-Seuche-Virus einkloniert wird.
28. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Zellklon mit kernloalisierter RNA-Polymerase die Expressionszelllinie PMLTT7 N (ZIM-Hinterlegungsnummer ZIM-0382) selektiert wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen in tierischen Zellen, das zur maximalen Expression fremder Gene geeignet ist. Diese neuartige Wirts-Vektor-System findet Anwendung bei der biotechnologischen Produktion von Wirkstoffen und Vakzinen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Verwendung tierischer Zelllinien ist in der biotechnologischen Wirkstoff- und Vakzineproduktion seit vielen Jahren üblich. Durch Einführung der entsprechenden Gene läßt sich der Ertrag gegenüber natürlicherweise produzierten Zelllinien häufig, aber nicht immer, wesentlich steigern. Die Effektivität der Produktbildung durch fremde Gene wird durch drei Parameter bestimmt: (1) die Transkription (mRNA-Synthese), (2) die Translation (Proteinsynthese) und (3) den Proteintransport. Während der Transport zum größten Teil von der Struktur des Proteins selbst abhängig ist und damit kaum beeinflussbar zu sein scheint, sind die beiden anderen Parameter teilweise von den das Strukturgen flankierenden DNA-Sequenzen, aber auch von der Verfügbarkeit zellulärer Transkriptionsfaktoren abhängig. Der Promotor des Fremdgens konkurriert mit den zellulären Genen um diese Faktoren und um die RNA-Polymerase. Damit wird das Ausmaß der Transkription auf ein Niveau begrenzt, daß nicht wesentlich über dem von effektiv abgelesenen zellulären Genen liegt und z.B. weit hinter der Expression viraler Gene bei einer Virusinfektion zurückbleibt. Letzteres schließt aber auch Amplifikation durch Replikation ein und endet letztendlich mit dem Zelltod.

Es muß eine Lösung gefunden werden, die zwar eine stärkere Transkription – als normalerweise in tierischen Zellen üblich – erlaubt, aber gleichzeitig das Ausmaß der Amplifikation durch regulierte Replikation in Grenzen hält, so daß die Langzeitkultivierung maximal produzierender Zellen möglich wird.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Erzeugung von tierischen Zellklonen für die Herstellung beliebiger Fremdproteine, die maximale Fremdproteinausbeuten liefern und gleichzeitig für die Langzeitkultivierung geeignet sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, prinzipiell nutzbares System zur Fremdgenexpression in tierischen Zellen zu schaffen, bei dem die Ablesung des Fremdgens von der zellulären Transkriptionsmaschinerie weitgehend unabhängig ist und gleichzeitig eine maximale und regulierbare Kopiezahl des Fremdgens erreicht wird.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst, indem zunächst ein die Replikation stimulierendes virales Gen unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors in tierische Zellen eingebracht wird. Die gewonnenen Zellen erhalten durch einen weiteren Gentransfer ein prokaryotisches RNA-Polymerase-Gen, das durch Anfügung eines Kernlokalisierungssignals und eines tierischen Promotors in den Zellen exprimiert wird und den Transport seines Produkts in den Zellkern gestattet. In diese Zellen wird anschließend ein Vektor eingebracht, der eine virale Replikationsstartsequenz, ein Selektionsgen und einen zur RNA-Polymerase homologen prokaryotischen Promotor enthält und bei dem ein Fremdgen unter Kontrolle des prokaryotischen Promotors gebracht wurde. Durch Induzierung des regulierbaren Promotors vor dem Replikationsgen wird die Replikation des Vektors stimuliert, wodurch eine große Zahl von Genkopien zur Transkription mit der prokaryotischen Polymerase verfügbar wird. Durch Entzug des Induktors wird die Replikation wieder gedrosselt.

Folgende erfindungsgemäße Verfahrensschritte werden durchgeführt:

1. Das als Replikationsgen verwendete T-Antigen-Gen eines Papovavirus wird ohne eigenen Promotor isoliert und an einen fremden Promotor gekoppelt, der vorzugsweise durch Glukokortikosteroidhormone regulierbar ist. Dabei wird bevorzugt das Groß-T-Antigen-Gen des Polyomavirus sowie der Promotor des Maus-Mamma-Tumorstadium (MMTV) verwendet. Die resultierende Rekombinante (z. B. pLT2-MMTV2, WP C 12 N/315016.8) wird zusammen mit einem Selektionsgen, bevorzugt dem Metallothionein-Gen in Form von pMT-I (Glanville et al. [1981] Nature 292, 267), in eine beliebige tierische Zelllinie transfiziert. Bei Verwendung des Polyoma-Groß-T-Antigens werden Nagerzelllinien (Maus, Ratte, Hamster) eingesetzt. Nach der Transfektion wird auf Anwesenheit des Metallothionein-Gens mit Schwermetallen, bevorzugt mit Cadmiumsulfat, selektiert. In den gewonnenen Zellkolonien wird T-Antigen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen und zwar sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Induktors für den Promotor, z. B. Dexamethason (10^{-6} M) im Falle des MMTV-Promotors. Ein Zellklon mit möglichst großer Differenz zwischen nichtinduziertem und induziertem T-Antigen wird für die weiteren Arbeiten ausgewählt.
2. In den ausgewählten Zellklon wird ein modifiziertes prokaryotisches RNA-Polymerase-Gen eingebracht. Das RNA-Polymerase-Gen, bevorzugt das des Phagen T7, wird zuvor am N-Terminus durch Anfügen eines eukaryotischen Kernlokalisierungssignals und eines tierischen Promotors modifiziert. Dabei wird vorzugsweise das Kernlokalisierungssignal des T-Antigens von Virus SV40 in Form einer synthetisch hergestellten DNA-Sequenz und der Promotor des Metallothionein-Gens verwendet. Die bevorzugt synthetisch hergestellte DNA-Sequenz kodiert die Aminosäuresequenz: Met-Asp-Lys-Val-Phe-Arg-Asn-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Arg-Leu-Asp. Die Rekombinante mit modifiziertem RNA-Polymerase-Gen (z. B. pMTT7 N, Abb. 1) wird zusammen mit einem anderen Selektionsgen, als unter Punkt 1 beschrieben, vorzugsweise dem Hygromycin-Resistenzgen in Form des Plasmids pY3 (Blochliger und Diggelmann [1984] Mol. Cell. Biol. 4, 1929) in den ausgewählten Zellklon transfiziert. Nach Selektion mit Hygromycin werden Kolonien isoliert und auf Vorhandensein der modifizierten RNA-Polymerase im Zellkern geprüft, bevorzugt mittels Immunfluoreszenz und in vitro Transkription mit Kernextrakten. So wird die erfindungsgemäße Expressionszelllinie PMLTT7 N erhalten, die in Kombination mit einem geeigneten Vektor zur Expression von Fremdgenen eingesetzt wird. Die erfindungsgemäße Zelllinie PMLTT7 N wurde im Zentralinstitut für Molekularbiologie in der Hinterlegungsstelle für Zelllinien unter der Nr. 0382 hinterlegt.
3. Der Vektor wird hergestellt, indem in ein bekanntes bakterielles Plasmid, bevorzugt ein pUC-Plasmid, nacheinander 3 Komponenten kloniert werden: Erstens ein Selektionsgen, bevorzugt das neo-Gen (Southern und Berg [1982] J. Mol. Appl. Genet. 1, 327); Zweitens die Replikationsstart-Sequenz des unter Punkt 1 gewählten Papovavirus, bevorzugt des Polyomavirus; Drittens der zum Punkt 2 gewählten RNA-Polymerase-Gen homologen Promotor, bevorzugt ein auf der Basis bekannter Sequenzen (Dunn und Studier [1983] J. Mol. Biol. 166, 477) synthetisierter T7-Promotor. Hinter dem Promotor befinden sich mehrere Restriktionsorte zur Klonierung von Fremdgenen (Abb. 2).
4. Das Fremdgen wird ohne eignen Promotor in einen Restriktionsort hinter den synthetischen Promotor kloniert, und die resultierende Rekombinante wird in die Expressionszellen transfiziert. Durch Selektion mit Geneticin werden Kolonien erhalten, in denen der Vektor extrachromosomal repliziert und das Fremdgen von der modifizierten Polymerase abgelesen wird. Die Genkopiezahl und damit auch die Expression wird durch Stimulierung der T-Antigen-Synthese mit dem entsprechenden Induktor, bevorzugt Dexamethason, erhöht. Zellen werden in der Massenkultur mehrere Tage im induzierten Zustand gehalten, und das Produkt wird aus dem Kulturmedium gewonnen. Zur Regenerierung der Zellen wird gegebenenfalls für mehrere Tage die Hormoninduktion abgesetzt.

Als Fremdgene können beliebige Wirkstoffgene, wie z. B. dasjenige für Wachstumshormon, Gewebeplasminogenaktivator, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Erythropoietin u. a. oder virale Antigen-Gene wie diejenigen des Hepatitis-Virus, des Influenza-Virus, AIDS-Virus, Maul- und Klauen-Seuche-Virus u. a. einkloniert und verwendet werden.

Der Vorteil der Erfindung besteht in einer von der zellulären Expressionsmaschinerie weitgehend unabhängigen Ablesung des Fremdgens sowie einer besseren Ausnutzung der Transkriptionsfähigkeit der prokaryotischen Polymerase durch Erhöhung der Genkopiezahl. Dadurch, daß die prokaryotische Polymerase im Zellkern der Wirtszelle wahlweise durch Induktion der Vektorreplikation mit Genkopien gesättigt wird und durch Rücknahme der Induktion eine Erhöhung der Zellen gewährleistet ist, kann für jedes Genprodukt ein optimales Langzeit-Produktionsschema individuell festgelegt werden.

Mit der erfindungsgemäßen Lösung wird damit ein prinzipiell nutzbares System zur Fremdproteinsynthese in tierischen Zellen bereitgestellt. Die erfindungsgemäß hergestellten Zellklone liefern maximale Fremdproteinausbeuten und sind gleichzeitig für die Langzeitkultivierung geeignet.

Für verschiedene Proteine können Syntheseleistungen von mehr als 50 µg/ml Medium/10⁶ Zellen/Tag erreicht werden.

