

(19) **DANMARK**

(11)

**DK 175366 B1**



(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

(51) Int.Cl<sup>7</sup>: **C 12 N 9/64 C 12 P 5/00**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1987 02881**

(22) Indleveringsdag: **1987-06-04**

(24) Løbedag: **1987-06-04**

(41) Alm. tilgængelig: **1987-12-07**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-09-13**

(30) Prioritet: **1986-06-06 US 871642**

(73) Patenthaver: **Genentech Inc., 460 Point San Bruno Blvd., South San Francisco, California 94080, USA**

(72) Opfinder: **William R. Arathoon, 420 Detroit Street, San Francisco, CA 94131, USA**

**Stuart E. Builder, 2827 Wemberly Drive, Belmont, CA 94002, USA**

**Anthony S. Lubiniecki, 11681 Bennington Woods Road, Reston, VA 22094, USA**

**Robert D. van Reis, 24 Cove Lane, Redwood City, CA 94065, USA**

(74) Fuldmægtig: **Plougmann & Vingtoft A/S, Sundkrogsgade 9, 2100 København Ø, Danmark**

---

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator**

(57) Sammendrag:

Fremstilling af vævstype-plasminogenaktivator, især via rekombinant-DNA-cellekultur, som inkluderer et trin, hvorved én eller flere mediumkomponenter, som er skadelige for udvindingen og aktiviteten af vævstype-plasminogenaktivator-produktet, fjernes uden ledsagende skade for værtscellernes udtrykkelsesevne.

Denne opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator og derivater deraf, især ud fra rekombinante værtscellekulturer i suspension.

5

#### Opfindelsens baggrund

Human vævstype-plasminogenaktivator omdanner plasminogen til plasmin. Det således producerede plasmin spalter  
10 proteolytisk fibrinmatriser, som danner skelettet i blodkoagler. Human vævstype-plasminogenaktivator formidler derved opløsningen af blodkoagler og er som følge heraf nyttige til behandling af forskellige trombotiske forstyrrelser.

15

Forkortelsen "t-PA" for human vævstype-plasminogenaktivator blev vedtaget efter forslag på the XXVIII Meeting of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis, Bergamo, Italien, 27. juli 1982. I denne beskrivelse med krav anvendes betegnelserne "human vævstype-plasminogenaktivator", "human t-PA", "t-PA", "human vævsplasminogenaktivator" eller "vævsplasminogenaktivator" human ydre (vævstype) plasminogenaktivator produceret f.eks. ud fra naturlig kilde ved ekstraktion og  
20 rensning [se Collen et al., EP offentliggørelsesskrift nr. 41766 (offentliggjort d. 16. dec. 1981 baseret på en første indlevering den 11. juni 1980) og Rijken et al., Journal of Biol. Chem. 256, 7035 (1981), der betragtes som inkorporeret i denne beskrivelse ved henvisning] og  
25 ved hjælp af rekombinante cellekultursystemer som beskrevet sammen med molekylets aminosyresekvens og andre egenskaber f.eks. i EP offentliggørelsesskrift nr. 93619 (offentliggjort den 9. november 1983 baseret på en første indlevering den 5. maj 1982), der betragtes som in-

35

- korporeret i denne beskrivelse ved henvisning. Betegnelserne dækker også biologisk aktive ækvivalenter til human vævstype-plasminogenaktivator, som adskiller sig mht. glycosyleringsmønstre, der menes at være afhængige af de specifikke anvendte dyrkningsbetingelser og arten af værten, hvorfra den humane vævstype-plasminogenaktivator er opnået, og som adskiller sig mht. en eller flere aminosyrer i den samlede sekvens.
- 10 Forskere i ansøgerfirmaets laboratorier producerede human vævstype-plasminogenaktivator i hovedsagen fri for proteiner, hvormed den almindeligvis er forbundet, via rekombinant-DNA-teknologi i prokaryotiske og eukaryotiske værter (EP offentliggørelsesskrift nr. 93619, ovenfor). Der er flere grunde til, at foretrække produktion af human vævstype-plasminogenaktivator i rekombinante eukaryotiske værter, såsom pattedyrceller. Eukaryotiske værter er i almindelighed effektive ved deres evne til at genkende og glycosylere specifikke aminosyrerester i den humane vævstype-plasminogenaktivators molekyle, som almindeligvis er glycosyleret i den native tilstand, at frembringe de naturligt forekomne covalente tværbindinger mellem forskellige cysteinrester i den humane vævstype-plasminogenaktivators molekyle og at komme tættere på den samlede konformationsstruktur af nativ human vævstype-plasminogenaktivator. Disse træk menes at være vigtige for fremstillingen af et biologisk aktivt og sikkert human-vævstype-plasminogenaktivator-produkt.
- 30 Imidlertid er produktionen af human vævstype-plasminogenaktivator ud fra rekombinante værtsceller ikke uden problemer. Således har det vist sig, at der opstår udbytte begrænsende vanskeligheder på grund af at cellerne, der producerer human vævstype-plasminogenaktivator,

sædvanlig dyrkes i nærvær af serum, forskellige fraktioner afledt fra blod eller andre dyrevæv eller hydrolysater deraf. Som konsekvens heraf udsættes human vævstype-plasminogenaktivator, som secerneret af sådanne  
5 celler, for store mængder serumproteiner og andre serumkomponenter. Det viste sig, at visse af disse komponenter uvægerligt komplicere rensningen af en intakt human vævstype-plasminogenaktivator til en farmaceutisk acceptabel form, fordi de danner vanskeligt fraskillelige  
10 bundne aggregatkomplekser med den humane vævstype-plasminogenaktivators molekyle. Disse aggregater skader også det humane vævstype-plasminogenaktivator-moles biologiske aktivitet og reducere således i det store og hele de almindeligt forventede udbytter af biologisk aktiv intakt human vævstype-plasminogenaktivator. Tilsætning af  
15 serumkomponenter forøger også den masse af urenheder, som må fjernes under rensning. Endvidere nedbryder mange af disse komponenter vævstype-plasminogenaktivator proteolytisk. Oprensning af den ønskede humane vævstype-plasminogenaktivator fra disse systemer frembyder tekniske vanskeligheder, hvilket kræver anvendelse af mere  
20 omfattende og dyrere procedurer.

I overensstemmelse med disse iagttagelser er det blevet  
25 foreslået at anvende serumfrie medier i forsøg på at undgå problemer ved produktion og rensning af endogent producerede plasminogenaktivatorer secerneret af dyrkede celler; se f.eks. 1) EP offentliggørelsesskrift nr. 113 319 (offentliggjort d. 11. juni 1984 baseret på en  
30 første indlevering d. 30. december 1982), som angiver fremstillingen af serumafhængige naturlige humane cellerlinier, som secernere endogent produceret human vævstype-plasminogenaktivator, 2) US patentskrift nr. 4 232 124, 3) US patentskrift nr. 4 328 314, 4) US pa-

tentskrift nr. 4 317 882 og 5) Gasser et al., In Vitro Cellular and Developmental Biology 21, 588 (1985). Ingen af disse referencer angår højdensitets-cellevækst og især ikke rekombinante suspensions-værtscelle-kulturer.

5 På den anden side angår EP offentliggørelsesskrift nr. 112 940 (offentliggjort d. 11. juli 1984 baseret på en første indlevering d. 30 december 1982) en fremgangsmåde til fremstilling af human vævstype-plasminogenaktivator, som involvere tilsætning af albumin, en proteinkomponent

10 i serum.

Der kendes også forskellige midler til fraktionering af cellekulturer for at fjerne f.eks. serumkomponenter; se f.eks. Van Reis et al., The Journal of Immunology 133,

15 758 (1984), som reducerede plasmaproteinniveauer fra leukocytcellekulturer og derved reducerede urenheder af rått endogent produceret humant  $\gamma$ -interferon (se også Van Reis et al., Methods in Enzymology 119, 77). I november 1982 rapporterede Van Reis et al. ved the Third Annual

20 International Congress for Interferon Research i Miami, Florida, U.S.A., vedrørende anvendelsen af tværstrømningsfiltrering for at reducere niveauer autologt plasmaprotein ved udvinding af endogent produceret humant  $\gamma$ -interferon fra en human cellekultur. Imidlertid kunne

25 den udvundne mængde interferon ikke forøges med yderligere fjernelse under produktionen.

Det er denne opfindelses formål at angive fremgangsmåde til produktion i stor målestok og udvinding af biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator fra en

30 kultur af human vævstype-plasminogenaktivator-producerende værtsceller. Et yderligere formål for opfindelsen er at angive sådanne fremgangsmåder til fremstilling af biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator, som

35

er i det væsentlig fri for proteolytisk nedbrydning, de-  
glycosylering, inhibering på grund af forskellige prote-  
ase inhibitorer og forurening og aggregation med serum-  
komponenter.

5

#### Sammenfatning af opfindelsen

t-PA-producerende værtsceller, såsom dem, der er blevet  
transficeret med rekombinante vektorer, som operabelt  
10 huser DNA, der koder for human vævstype-plasminogenak-  
tivar, dyrkes i et vækstunderstøttende medium, for-  
trinsvis indeholdende én eller flere komponenter, som,  
medens den lettere cellevækst er skadelig for udvindin-  
gen og aktiviteten af det udtrykte humane vævstype-plas-  
15 minogenaktivator-produkt. I det væsentlige alle sådanne  
komponenter udelukkes før dyrkningen eller fjernes fra  
det vækstunderstøttende medium ved medium udskiftning,  
fortrinsvis via tværstrømningsfiltrering, under dyrk-  
ningen. Efter fjernelsen bevarer værtscellekulturen ud-  
20 trykkelsesevnen med eller uden behov for yderligere cel-  
lerreplisering.

Biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator pro-  
duceres derefter ved udtrykkelse i cellerne holdt i  
25 værtscellekulturen, som er i det væsentlige fri for  
skadelige komponenter. Den biologisk aktive humane vævs-  
type-plasminogenaktivator isoleres derpå fra cellerne  
før yderligere rensning, som tilpasser til den farmaceu-  
tisk indgivning.

30

Det har uventet vist sig, at fremgangsmåden ifølge op-  
findelsen gør det muligt at fremstille rensset intakt  
human vævstype-plasminogenaktivator i udbytter, som ikke  
hidtil var troet opnåelige. Endvidere tilvejebringer

35

fremgangsmåderne ifølge opfindelsen biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator med en sammensætning på mindst 50% enkelt-kæde-form i modsætning til det produkt med en sammensætning på væsentlig mindre enkelt-kæde-form, som blev opnået før den foreliggende opfindelse. Dette menes at være signifikant, foruden at være uventet, da det tyder på, at fremgangsmåderne ifølge opfindelsen frembringer produkt, som er i det væsentlige frit for proteolytisk nedbrydning ved forskellige spaltningsscentre. Endvidere viser materialet, som er overvejende i enkelt-kæde-form, sig at have mindst den samme effektivitet som to-kæde-materiale og udviser mindre fibrinogennedbrydning, resultater, som kan være af vigtighed ved kliniske anvendelser.

#### Detailbeskrivelse

##### A. Alment

I tilfælde af pattedyrværtscellekulturer er de skadelige mediumkomponenter typisk fra blod eller andet dyrevæv afledte proteaser, glycosidaser, såsom neuramididase, protease inhibitorer, albumin osv, som oprindeligt er tilstede i det vækstunderstøttende medium.

Betegnelsen "biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator" henfører til den ovenfor beskrevne humane vævstype-plasminogenaktivator, som er i stand til at formidle in vivo opløsningen af fibrinblodkoagler.

Betegnelsen "værtscel  
t-PA-producerende vævstype-plasminogenaktivator, såsom dem, der er blevet transficeret af en udtrykkelsesvektor, operabelt huser DNA, som koder for vævstype-plasminogenaktivator.

"Rekombinant-værtscelle-kultur" er en "værtscellekultur" transficeret med en udtrykkelsesvektor, som operabelt huser DNA, der koder for vævstype-plasminogenaktivator. "Rekombinant-værtscelle-suspensionskultur"-systemer foretrækkes.

En lang forskellige værtsceller kan anvendes ved udøvelsen af opfindelsen. Egnede værtsceller er fortrinsvis i stand til at transficeres med rekombinante vektorer, som operabelt huser DNA, der koder for human vævstype-plasminogenaktivator, og ved udtrykkelse producere biologisk aktiv human vævstype-plasminogenaktivator og er modtagelig for vækst og opretholdelse i suspensionskultur. I overensstemmelse hermed er enhver værtscelle, som producerer t-PA og/eller ved rekombinant teknik kan bringes til at producere t-PA, inden for opfindelsens omfang. Værtsceller er fortrinsvis pattedyrceller og inkluderer rekombinante human-vævstype-plasminogenaktivator-secreterende kinesisk-hamster-ovarier-(CHO)-celler (se EP offentliggørelsesskrift nr. 93619, ovenfor) (ATCC nr. CCL61).

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen dyrkes værtsceller, som er i stand til at producere human vævstype-plasminogenaktivator først som en vækstsuspension i et "vækstunderstøttende medium". Dette vækstunderstøttende medium kan være ethvert inden for faget kendt standard medium eller variationer deraf, som er i stand til at understøtte en kultur af den bestemte cellelinie, som anvendes til at fremstille humant vævstype-plasminogenaktivator [se f.eks. ATCC Media Handbook, Ed: Cote et al., American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A. (1984)]. Et vækstunderstøttende medium for pattedyrceller indeholder f.eks. fortrinsvis et serumsup-

- plement, såsom fetalt kalveserum, eller en anden supple-  
rende komponent, der almindeligvis anvendes til at lette  
cellevækst og -deling, såsom hydrolysater af dyrekød el-  
ler mælk, væv eller organekstrakter, mascererede koagler  
5 eller ekstrakter deraf osv. Det indledende vækstunder-  
støttende medium kan også være et medium, som muliggør  
vækst og opretholdelse af værtscellerne og udtrykkelsen  
af human vævstype-plasminogenaktivator. Desuden kan der  
anvendes et standard vækstmedium, som er deficient mht.  
10 glycin og/eller hypoxanthin og/eller thymidin og/eller  
indeholdende methotrexat, til at opretholde selektivt  
tryk på rekombinante CHO-celler indeholdende en udtryk-  
kelsesvektor, der er i stand til at udtrykke human vævs-  
type-plasminogenaktivator, såvel som dihydrofolatreduk-  
15 tase med en lav bindingsaffinitet for methotrexat. Andre  
selekterbarer og/eller forstærkelige markører kan også  
anvendes. Andre egnede mediumkomponenter inkluderer  
f.eks. transferin, insulin og forskellige metaller.
- 20 I en udførelsesform sker der, efter at værtscellerne er  
vokset til en passende celledensitet, f.eks. fra omkring  
 $1:10^6$ /ml til omkring  $3 \times 10^7$ /ml for CHO-celler, en fjer-  
nelse af de skadelige komponenter i det vækstunderstøt-  
tende medium ved mediumudskiftning fortrinsvis via  
25 "tværstrømsfiltrering". Tværstrømsfiltrering henfører  
til en filtreringsmåde, hvorved en suspension af human-  
vævstype-plasminogenaktivator-producerende celler strøm-  
mer i det væsentlige parallelt med et filter, som er  
permeabelt for en anden komponent i suspensionen end  
30 celler.

Tværstrømsfiltreringsprocessen er karakteriseret ved et  
sæt strømningsdynamiske parametre, herunder  $Re = \text{Rey-}$   
nolds tal,  $\gamma_w = \text{vægforskydningshastighed}$ ,  $\Delta P = \text{tryk-fald}$

og TMP = transmembrantryk.  $Re$ ,  $\gamma_w$  og  $\Delta P$  vil afhænge af filtreringssystemets geometri, strømningsbetingelserne og væskeegenskaberne. Hvis der f.eks. anvendes et hul-fiber-filtreringssystem, kan man udregne disse parametre som følger:

$$Re = 2\rho Q_s / \eta_s n \pi r_h$$

$$\gamma_w = 4Q_s / n \pi r_h^3$$

$$\Delta P = 8Q_s L \eta_s / n \pi r_h^4$$

10

hvor  $\rho$  = celledensiteten,  $Q_s$  = suspensions-recirkuleringshastigheden,  $\eta_s$  = suspensionens viskositet,  $n$  = antallet af hulfibre,  $R_h$  = hulfibrens indre radius og  $L$  = hulfiberlængden. Lignende ligninger kan afledes for andre strømningsvejgeometrier. Det gennemsnitlige transmembrantryk kan udregnes som:

15

$$TMP = P_{in} - P_f - \Delta P / 2 = Q_f R \eta_f / A$$

20

hvor  $P_{in}$  = indløbstryk,  $P_f$  = filtrattryk,  $Q_f$  = filtreringshastighed,  $R$  = membranmodstand,  $A$  = membranareal og  $\eta$  = filtratsviskositet. I en foretrukken udførelsesform vælges strømningsvejgeometrien og arbejdsparametrene således at celleaflejringen på filtreringsmembranen minimeres, hvorved effektiviteten af separationsprocessen forhøjes, og den forskydningsinducerede cellebeskadigelse formindskes. Celleaflejringen kan bestemmes empirisk som:

25

30

$$DP = v^{1/2} U \lambda / r_c^2 \gamma^{3/2}$$

hvor  $DP$  = aflejningsparameter,  $v$  = kinetisk viskositet,  $U$  = filtreringshastighed,  $\lambda$  = empirisk funktion af celledensitet,  $C_c$ , og  $r_c$  = celleradius. Dermed vil

35

tværstrømsfiltreringsprocessen blive defineret ved cel-  
 lesuspensionen ( $\rho$ ,  $\eta_s$ ,  $\eta_f$ ,  $v$ ,  $C_c$  og  $r_c$ ), valg af mem-  
 bran- og strømningsgeometri  $n$ ,  $r_h$ ,  $L$ ,  $R$  og  $A$ ) og sty-  
 ringen af arbejdsparametre ( $Q_s$  og  $Q_f$ ). I en foretrukken  
 5 udførelsesform vælges strømningsvejgeometrien og ar-  
 bejdsbetingelserne således, at  $Re < 2100$ , og  $DP < 0,35$ .

Koncentrationen af skadelige komponenter reduceres ved  
 en tværstrømsfiltreringsproces, hvorved cellesuspensi-  
 10 onen recirkuleres igennem filtreringsapparatet, og en  
 portion af strømmen tages fra som cellefrit filtrat. Et  
 konstant cellesuspensionsvolumen kan opretholdes ved  
 tilsætning af medier, som ikke indeholder skadelige kom-  
 ponenter. Den endelige restmængde af skadelige komponent-  
 15 ter kan udregnes som:

$$C_p = \frac{C_o V_x e^{(-V_m/V_x)}}{V_p}$$

20

hvor  $C_p$  = koncentration af skadelige komponenter i pro-  
 duktionssuspensionen,  $C_o$  = begyndelseskonzentration af  
 skadelige komponenter i cellevækstsuspensionen,  $V_x$  =  
 25 volumen af cellesuspension under medieudskiftning,  $e$  =  
 grundtallet for naturlig logaritme,  $V_m$  = volumen af ud-  
 skiftningsmedie og  $V_p$  = endeligt volumen af produktions-  
 suspensionen. Det volumen af udskiftningsmedie, som kræ-  
 ves til at reducere koncentrationen af skadelige kompo-  
 30 nenter til et forud fastsat niveau, kan udregnes som

$$V_m = V_x \ln(C_o V_x / C_p V_p)$$

hvor  $\ln$  = naturlig logaritme. Det er klart ud fra denne ligning, at en foretrukken udførelsesform af denne opfindelse vil involvere en begyndelseskonzentration af cellesuspensionen til en minimal værdi  $V^*$  før den førnævnte medieudskiftning med konstantvolumen. Reduktion af koncentrationen af skadelige komponenter gennemføres og ledes ved I) koncentrering af cellevækstsuspensionen fra den oprindelige volumen  $V_0$  til  $V_x$ ; II) gennemførelse af medieudskiftning ved konstant volumen og III) yderligere reduktion, hvis  $V_x < V_p$ .

Hvis f.eks. volumenet af startcellekulturen før mediumudskiftning er 100 liter, kan der opnås en samlet 10 000 ganges reduktion i koncentrationen af skadelige komponenter ved koncentrering af cellesuspensionen til 10 liter, gennemførelse af en medieudskiftning under anvendelse af 45 liter medium og anvendelse af et produktionsvolumen på 1000 liter.

Det er således muligt kvantitativt at bestemme fortyndingsfaktoren af det indledende vækstunderstøtningsmedium under mediumudskiftning således, at mængden af de skadelige komponenter i den resulterende værtscellesuspension er under en forudfastsat koncentration, hvorved de skadelige virkninger af sådanne komponenter minimeres. Sådanne fortyndingsfaktorer kan bestemmes for hver tjarch af vækstmedium. F.eks. kan pattedyrvækstmedier suppleret med forskellige koncentrationer af serum kræve forskellige fortyndingsfaktorer for at reducere mængden af uønskelige komponenter til funktionel ækvivalente koncentrationer, som tillader produktionen af farmaceutisk acceptabel human vævstype-plasminogenaktivator. I overensstemmelse hermed kan fortyndingsfaktoren vælges således, at mængden af serum i det endelige pattedyrcel-

leudtrykkesmedium f.eks. er mindre end ca. 1% af den totale, som blev anvendt fra starten. De her anvendte filtreringsmembraner kan udvælges blandt alle de inden for faget kendte, som har en egnet membran og konfiguration, således at de er i stand til at tilbageholde de human-vævstype-plasminogenaktivator-producerende celler ifølge opfindelsen, medens de tillader de forskellige skadelige komponenter at passere igennem. Således kan man anvende enhver egnet membran, som muliggør tilbageholdelsen af celler under de valgte væskedynamiske betingelser, medens den tillader de skadelige komponenter at passere igennem til fjernelse. En øvre grænse for porestørrelse på omkring 5  $\mu\text{m}$  og en nedre grænse på omkring 0,1  $\mu\text{m}$  vil være egnede.

Det friske udskiftningsmedium er i det væsentlige frit for de skadelige komponenter. F.eks. indeholder det ingen væsentlige mængder af sådanne skadelige komponenter som proteaser, neuramedidaser, protease inhibitorer osv. Et sådant medium vil selvfølgelig variere med den celletype, som anvendes til at producere human vævstype-plasminogenaktivator, og kan f.eks. vælges blandt dem, som er til rådighed inden for faget. Det kan være det samme som det endelige udtrykkesmedium (af nemhedsgrunde) eller et eller andet mindre rigt medium, såsom et pufret isotonisk saltopløsningsmedium.

Til de her beskrevne human-vævstype-plasminogenaktivator-producerende CHO-celler kan det endelige udtrykkesmedium f.eks. dannes ud fra et standard medium til dyrkning af CHO-celler, som ikke suppleres med fetalt kalveserum. Et eks. på det endelige udtrykkesmedium er en blanding af lige dele Delbecco-modificeret Eagles medium (højglucose) og Ham's F-12 medium.

I andre udførelsesformer kan de skadelige komponenter udelukkes eller i det væsentlige udelukkes før dyrknin-  
gen, eller de kan fjernes, f.eks. ved centrifugerings-  
eller udfældningsteknik.

5

Den humane vævstype-plasminogenaktivator isoleres og  
renses derpå fra udtrykkelsesmediet og anvendes som far-  
maceutisk middel til behandling af forskellige vaskulære  
tilstande eller sygdomme.

10

B. Foretrukken udførelsesform

I en foretrukken udførelsesform dyrkes CHO-celler, som  
er i stand til at producere human vævstype-plasminogen-  
15 aktivator, som en suspension i et CHO-medium suppleret  
med fetalt kalveserum til en forud fastsat celledensi-  
tet. Cellesuspensionen koncentrerer derpå ved tvær-  
strømsfiltrering. Serumet fjernes derefter fra den kon-  
centrerede suspension ved tværstrømsfiltrering, medens  
20 der kontinuert tilsættes serumfrit medium med samme  
hastighed som serumholdigt medium fjernes. Aktiv human  
vævstype-plasminogenaktivator produceres derefter af  
CHO-cellerne suspenderet i det serumfrie udtrykkelses-  
medium. Den således producerede humane vævstype-plasmi-  
25 nogenaktivator secernerer af CHO-cellerne til udtrykkel-  
sesmediet og kan separeres fra dette ved standard tek-  
nik.

Dyrkningsbeholdere af forskellige kapaciteter anvendes  
30 til at dyrke suspensioner af CHO-celler. Hver dyrknings-  
beholder forbindes via indløb med en række porøse tan-  
gentielstrømsfiltre, som igen er forbundet via udløb  
tilbage til dyrkningskammeret. Efter væksten pumpes sus-  
pensionerne af CHO-celler og medium indeholdende serum

35

igennem rækken af porøse tangentialstrømsfiltre først for at koncentrere suspensionen og derefter for at til-lade fjernelse af serumkomponenterne fra suspensionen under mediumudskiftning. CHO-cellesuspensionen recirkuleres igennem filterne og dyrkningsbeholderne, hvilket muliggør fjernelse af en portion af det gamle medium og serumkomponenter. En forsyning af frisk sterilt udtrykkelsesmedium, som ikke indeholder serum, sættes til celsuspensionen for at opretholde et nominelt volumen i dyrkningsbeholderen. Efter at serumkoncentrationen er blevet reduceret på denne måde til en forud fastsat koncentration ved kontinuert medium udskiftning, overføres cellerne via seriliserede rør til en andenbeholder indeholdende serumfrit udtrykkelsesmedium, hvori der seceres human vævstype-plasminogenaktivator. Derefter kan den humane vævstype-plasminogenaktivator udvindes ved standard teknik.

### C. Eksempler

20

#### Cellevækst, mediumudskiftning og produktionsfaser

Kinsisk-Hamster Ovary (CHO)-celler (ATCC nr. CCL61), transficeret med udtrykkelsesvektoren pETPFR (se EP of-fentliggørelsesskrift 93619 ovenfor) og derfor udtrykkene rekombinant t-PA, blev genoplivet fra opbevaring over flydende nitrogen og dyrket i medium bestående af 1:1 blanding af Ham's F-12 og Dulbecco-modificeret Eagle-medium. Blandingen indeholdt ikke hypoxanthin eller thymidin. Dialyseret eller diafiltreret fetalt okseserum (7 vol. %) og methotrexat (til 500 nM) sættes til mediet. Cellerne blev dyrket i suspensionskultur i glasbeholdere inkuberet ved omkring 37 °C. Celler blev subdyrket, og populationen expanderet i dette medium for

35

hver 3-5 dage. Når der var akkumuleret tilstrækkeligt celler, blev de overført til en 10 liters fermenter af rustfrit stål til en yderligere vækstperiode på omkring 3 dage. Til denne vækstfase blev mediesammensætningen  
5 ændret til at give bedre celleudbytter og indeholdte både hypoxanthin og thymidin, men intet methotrexat. I dette medium blev der inkorporeret udialyseret fetalt okseserum (200 vol. %) og under den 3 dages vækstfase forøgedes cellepopulationsdensiteten fra omkring  $0,25 \times$   
10  $10^6$  celler/mL til omkring  $1,0 \times 10^6$  celler/mL.

Cellerne blev derpå udsat for mediumudskiftning som beskrevet ovenfor, idet de blev resuspenderet i serumfrit produktionsmedium i omkring 90 timer. Mediumudskift-  
15 ningen blev frembragt som følger:

Et hulfiber-tangentialstrømsvifter og dermed forbundne indløbs- og udløbsiliconegummirør blev steriliseret i en autoklav og derpå forbundet med 10 liters produktions-  
20 beholderen via dampsteriliserbare forbindelser. Det anvendte filter var en polysulfon-hulfiberenhed (Fremstiller: A.G. Technology, Inc., filter No. 1BZE100801AL) indeholdende 280 hule fibre med 0,75 mm indre diameter og numinelt 0,1  $\mu$ m porer langs deres længder. Denne enhed  
25 havde et filtreringsarealt på 0,386 m<sup>2</sup>. Cellerne blev recirkuleret i igennem de hule fibre og tilbage til beholderen ved anvendelse af en Watson Marlow to-labs-pumpe. Der anvendtes en recirkuleringshastighed på omkring 3,5 liter/min., og samtidig blev en portion af væsken  
30 omtrukket og smidt væk som et klart filtrat med en hastighed på omkring 211 ml/min. På denne måde blev cellerne tilbageholdt, og kulturvoluminet reduceret til omkring 5,2 liter. Ved dette tidspunkt blev frisk sterilt serumfrit medium (af samme sammensætning som an-

vendt tidligere, men uden indhold af okeserum eller komponenter afledt fra det) pumpet ind i dyrkningsbeholderen med en hastighed på omkring 211 ml/min., hvorved voluminet holdtes konstant, medens det gamle medium blev  
5 fortyndet ud.

55 liter frisk serumfrit medium blev pumpet igennem systemet til opnåelse af en beregnet reduktion i serumkoncentrationen på omkring 190 000 gange eller mindre end  
10 0,0001 vol. %, når en aliquot af celled suspensionen sættes til frisk serumfrit medium i en separat 10 liters fermenter af rustfrit stål. Cellerne blev derpå inkuberet i produktionsfasen i omkring 90 timer ved 37 °C. Prøver blev udtaget fra kulturen, klaret ved centrifugering og opbevaret ved -20 °C til efterfølgende analyse.  
15

I et andet eksempel, som blev kørt parallelt, var alle de anvendte betingelser celler og medier magen til undtagen hulfilteret. I dette tilfælde indeholdt filteret  
20 290 hule filtre og havde et filtreringsareal på 0,40 m<sup>2</sup>, men var ellers øvrigt magen til det, der er beskrevet ovenfor (Fremstiller: A.G. Technology, Inc., filter No. 1810902 AL).

25

#### Analysemetoder.

Prøver blev behandlet og analyseret for at påvise de skadelige virkninger af okeserum på t-PA produceret af  
30 de i disse eksempler anvendte CHO-celler. Prøver af den klarede cellekulturvæske fra den serumfrie produktionsfase blev optøet, reduceret med  $\beta$ -mercaptoethanol og underkastet S.D.S. elektroforese under anvendelse af det diskontinuerte laemmli-system (Laemmli, Nature, 227,  
35

680, (1970)). De på denne måde separerede proteiner blev underkastet sølvfarvning (Morrissey, Anal. Biochem. 117, 307, (1981)) eller blev overført til et nitrocellulose ark (overførsel i 4 timer ved 8 °C og 0,5 A på 0,45 µm  
5 nitrocellulose under anvendelse af metoden beskrevet af: Towbin et al., PNAS 76, 6350, (1979)). t-PA-proteinerne, proteinfragmenter og komplekser med høj molekylvægt indeholdende t-PA blev visualiseret på nitrocellulose-arket ved en indirekte enzymforbundet i monoprvøvnings-  
10 teknik beskrevet som følger: en indledende reaktion med de bundne t-PA-proteiner og kanin-anti-t-PA-antistof blev efterfulgt af behandling med et andet antistof. Dette var et peberrodperoxidase-forbundet anti-kanin-IgG (dannet i geder). Efter denne reaktion resulterede til-  
15 sætning af chromophoren 4-Cl-nathol i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og PBS i farveudvikling i områderne af bundet antistof, hvilket viser de elektrophoretiske mønstre af t-PA og forbundne proteiner. Ved anvendelse af disse teknikker kunne t-PA'ens tilstand i de rå dyrkningsvæsker således bestem-  
20 mes uden yderligere rensning.

### Resultater

For at påvise de skadelige påvirkninger af fetalt okse-  
25 serum på t-PA blev prøver fra produktionsfasen inkuberet med phosphatpuffret saltopløsning (PBS) eller med 0,175 vol. % eller 1,75 vol. % fetalt okseserum i 22 timer eller 46 timer, før de blev analyseret som beskrevet ovenfor. Resultater af dette er vist i den sølvfarvede  
30 gel i fig. 1 og den tilsvarende immuafdykning i fig. 2.

Fig. 1 er en sølvfarvet gel af t-PA-prøver opnået som beskrevet ovenfor.

Fig. 2 er en immunoafdupning af en identisk gel vist i fig. 1.

I figurene viser

5

| <u>Bane nr.</u> | <u>Prøve</u>                                                                                     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1               | Molekylvægtstandarder [92,5 kilodalton (K), 66,2K, 45K, 31K, 21,5K, 14,4K]                       |
| 10              | 2 Autentisk t-PA-referencestandarder                                                             |
|                 | 3 Cellekulturvæsker indeholdende t-PA (laboratoriereference)                                     |
| 15              | 4 Cellekulturvæske fra produktionsfase-prøve                                                     |
|                 | 5 Produktionsfase-prøve; inkuberet i 22 timer ved 37 °C med phosphat pufret saltopløsning (PBS). |
| 20              | 6 Produktionsfase-prøve; inkuberet i 46 timer ved 37 °C med PBS.                                 |
|                 | 7 Tom bane                                                                                       |
| 25              | 8 Produktionsfase-prøve; inkuberet i 22 timer ved 37 °C med 0,175 vol.% fetalt okse-serum (FBS). |
| 30              | 9 Produktionsfase-prøve; inkuberet i 46 timer ved 37 °C med 0,175 vol.% FBS.                     |
|                 | 10 0,175 vol.% FBS alene; inkuberet i 22 timer ved 37 °C.                                        |
| 35              |                                                                                                  |

- 11            0,175 vol.% FBS alene; inkuberet i 46 timer  
ved 37 °C.
- 5            12            Produktionsfase-prøve; inkuberet i 22 timer  
ved 37 °C med 1,75 vol.% FBS.
- 13            Produktionsfase-prøve; inkuberet i 46 timer  
ved 37 °C med 1,75 vol.% FBS.
- 10           14           1,75 vol.% FBS alene; inkuberet i 22 timer  
ved 37 °C.
- 15           15           1,75 vol.% FBS alene; inkuberet i 46 timer  
ved 37 °C.

15

I fig. 1 og 2 er banerne 2 og 3 t-PA-referencestandarder (hvor enkelt-kæde-t-PA viser sig som båndet ved høj molekylvægt og 2-kæde-t-PA viser sig som båndene ved den lavere molekylvægt).

20

De iagttagne skadelige virkninger af at have fetalt okseserum (FBS) tilstede er a) at forårsage en forsvinden af intakt t-PA med en ledsagende opsamling af forskellige proteolytisk spaltede former og fragmenter deraf (se banerne 8 og 9 i fig. 2) og b) dannelsen af kompleks materiale med højere molekylvægt i området 90-200 kilodalton (se banerne 12 og 13 i fig. 2).

25

Resultaterne viser, at når den serumfrie cellekultur-væske, opnås som beskrevet ovenfor under "cellevækst, mediumudskiftning og produktionsfaser", blev inkuberet i nærvær af PBS i 22 eller 46 timer, forblev den i det væsentlige uændret (se banerne 5 og 6 i fig. 1 og 2). Derimod sker der både proteolytisk nedbrydning og dan-

35

5 nelse af komplekser af t-PA med høj molekylvægt, hvis  
fetalt okse-serum får lov til at blive i produktionsfase-  
cellekulturmediet. Fjernelse af serum ved den her be-  
skrevne mediumudskiftningsproces fjerner i det væsent-  
lige dets skadelige virkninger.

10

15

20

25

30

35

## P a t e n t k r a v :

5

-----

1. Fremgangsmåde til fremstilling af biologisk aktiv  
vævstype-plasminogen-aktivator i en rekombinant-værts-  
celle-kultur, som er i stand til ved rekombinant-ekspres-  
sion at producere biologisk aktiv human vævstype-plas-  
minogen-aktivator, k e n d e t e g n e t ved, at

10

a) rekombinant transficerede værtsceller i suspensions-  
kultur dyrkes i et vækstunderstøttende medium, som mulig-  
gør væksten og opretholdelsen af værtscellerne,

15

b) komponenter i dyrkningsmediet, som er skadelige for  
udvindingen og den biologiske aktivitet af den humane  
vævstype-plasminogen-aktivator, fjernes fra mediet under  
bevarelse af værtscellernes ekspressionsevne ved hjælp af  
en tværstrømsfiltreringsproces karakteriseret ved et sæt  
af fluiddynamiske parametre under anvendelse af et fil-  
treringsapparat med en egnet membran, således at celle-  
suspension recirkuleres gennem filtreringsapparatet, og  
en portion af mediet fjernes som cellefrit filtrat, idet  
den homogene karakter af cellekultursuspensionen bibehol-  
des,

20

25

c) filtrat erstattes med et medium uden komponenter, som  
er skadelige for udvindingen og den biologiske aktivitet  
af human vævstype-plasminogen-aktivator,

30

d) den biologisk aktive humane vævstype-plasminogen-akti-  
vator isoleres fra den mediumudskiftede kultur.

35

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at tværstrømsfiltreringen gennemføres over en flad filtreringsmembran.
- 5 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at tværstrømsfiltreringen gennemføres over væggen af en porøs hul fiber.
- 10 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at tværstrømsfiltreringen gennemføres over en spiralopvundet membran.
- 15 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de vækst- og cellereplicerings-understøttende mediumkomponenter er afledt fra blod eller væv eller derivater deraf.
- 20 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at værtscellerne omfatter pattedyrceller, som er i stand til at producere human vævstype-plasminogen-aktivator.
- 25 7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at pattedyrcellerne omfatter rekombinant transficerede CHO-celler.
- 30 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at værtscellerne indeholder en ekspressionsvektor, som er i stand til at udtrykke human vævstype-plasminogen-aktivator og en opformérbar markør, og at cellerne dyrkes i et medium valgt således at der opretholdes selektionstryk til gunst for celler, der indeholder multiple kopier af den opformérbare markør, forud for trin (d).

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t  
ved, at den opformérbare markør er dihydrofolatreductase  
med lav bindingsaffinitet for methotrexat, og at mediet  
valgt således, at der opretholdes selektionstryk, inde-  
holder methotrexat.

5

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved, at tværstrømsfiltreringsprocessen er karakteriseret  
ved en celledponeringsparameter, DP, og et sæt af fluid-  
dynamiske parametre, som inkluderer Reynolds tal, Re, og  
at celleduspensionen, apparatet og apparatets drifts-  
betingelser vælges således, at Re er mindre end 2100, og  
DP er mindre end 0,35.

10

15

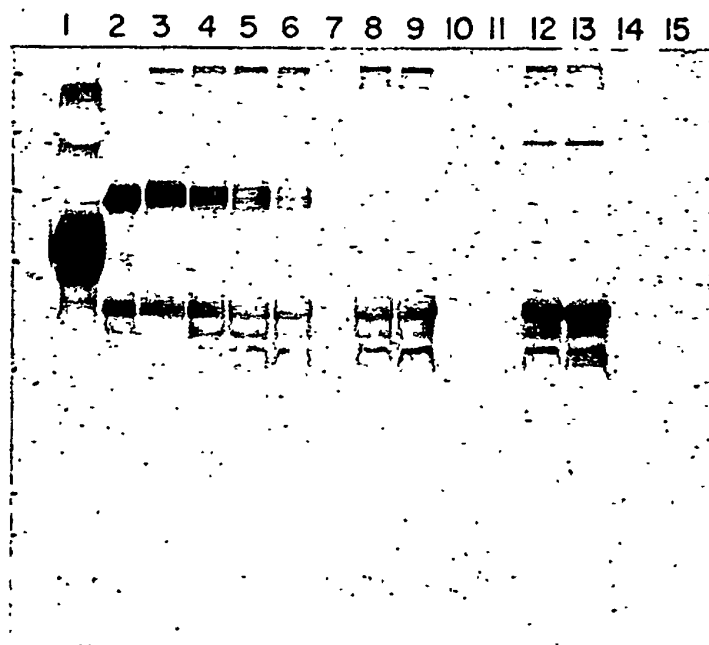
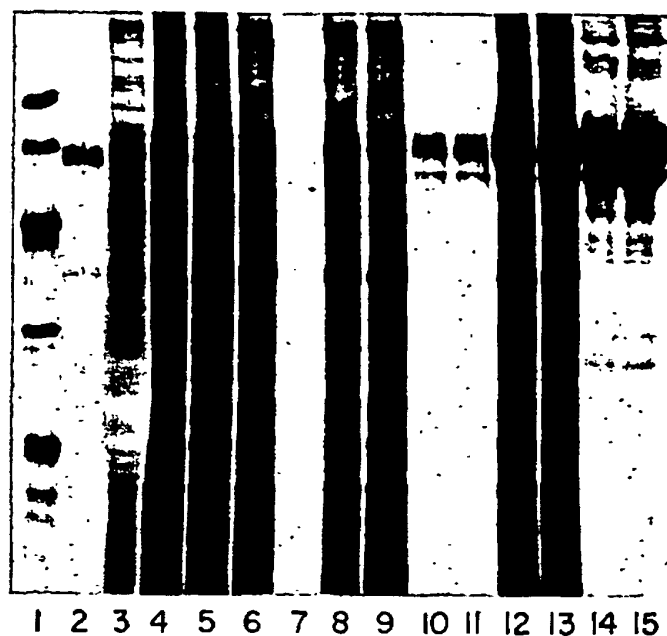
20

25

30

35

*Fig.1.*



*Fig.2.*