



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 35 510 T2 2006.08.24

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 318 198 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 35 510.1

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 000 391.7

(96) Europäischer Anmeldetag: 13.05.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.06.2003

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 22.03.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 24.08.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/79 (2006.01)  
C07K 14/755 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9601855 14.05.1996 SE  
18874 P 29.05.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Biovitrum AB, Stockholm, SE

(72) Erfinder:

Adamson, Lars, 181 33 Lidingö, SE; Walum, Erik,  
184 60 Akersberga, SE; Dixelius, Johan, 753 24  
Uppsala, SE; Lima Lie, Kristina, 117 65 Stockholm,  
SE

(74) Vertreter:

WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und  
Rechtsanwälte, 81541 München

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids unter Hinzufügung eines Chymo-  
trypsinhemmstoffes zum Zellkulturmedium

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

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

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Proteinen und Polypeptiden, und ein Zellkulturmedium zur Verwendung bei der Herstellung. Insbesondere betrifft die Erfindung die Kultivierung von Zellen in einem Zellkulturmedium, das einen Chymotrypsin-Inhibitor enthält.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Proteolytische Enzyme sind an allen Körperfunktionen beteiligt, und die meisten haben natürliche regulatorische Gegenspieler, d.h. Protease-Inhibitoren. Die International Commission on Enzymes hat eine systematische Einordnung und Nomenklatur für proteolytische Enzyme eingeführt: 1) Serinproteinasen, 2) Cysteinproteinasen, 3) Asparaginsäureproteininasen, 4) Metalloproteininasen, die alle nach einer wichtigen Gruppe in ihrem aktiven Zentrum eingeordnet sind, und schließlich 5) eine Untergruppe der Proteininasen mit einem noch unbekannten katalytischen Mechanismus (Borivoj Keil, „Specificity of Proteolysis“, Springer-Verlag NY, 1992, 336 Seiten). Das Ziel dieser Einordnung ist nicht funktional, noch ist es auf die biologische Quelle des betreffenden Enzyms bezogen. Das Problem der Einordnung von proteolytischen Enzymen, die oft als Proteasen abgekürzt werden, wird im Einleitungsteil beschrieben: „Die Einordnung von Enzymen in der Enzymnomenklatur (1200) erfolgt nach den Reaktionen, die durch sie katalysiert werden. Diese Regel kann schwerlich auf Endopeptidasen angewendet werden. Die Gesamtreaktion, die durch diese große Gruppe von Enzymen katalysiert wird, ist im Wesentlichen immer gleich: die Spaltung einer Peptidbindung. Allerdings kann ein Protein nicht im klassischen Sinn als Substrat angesehen werden: Es enthält Hunderte von potentiellen Substraten, eine Reihe von qualitativ verschiedenen Peptidbindungsarten mit unterschiedlicher quantitativer Darstellung. Darüber hinaus variiert die Verfügbarkeit dieser Bindungen gemäß der Gesamtkonformation der Polypeptidkette. Daher stellt die Enzymnomenklatur eine Ausnahme der Endopeptidasen von der Regel dar: anstelle einer Einordnung gemäß der katalysierten Reaktion werden Endopeptidasen durch die Art ihre Wirkstelle klassifiziert. Auf diese Weise werden in derselben Gruppe Enzyme mit völlig anderer Spezifität gefunden (wie Trypsin, Chymotrypsin und Prolylpeptidase)“. Wie weiter in derselben Quellenangabe veranschaulicht ist, ist die Substrat- und Inhibitor-Spezifität weit komplizierter als ein einfacher Bezug auf fünf Enzymklassen. Trotzdem wird diese Einordnung weithin in der Literatur verwendet, zum Beispiel wenn verschiedene Proteolysewirkungen beschrieben werden sollen.

**[0003]** Bei Serinproteinasen ist eine Serinkomponente für die Wirksamkeit wesentlich, d.h. die Spaltfunktion. Die Spezifität von verschiedenen Serinproteinasen beruht auf den Merkmalen der Kavitäten, die zum Aufbau von entsprechenden Substraten passen. Eine tiefe Kluft erklärt die Spezifität von Chymotrypsin für aromatische und andere umfangreiche hydrophobe Seitenketten (siehe L. Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman und Co., San Francisco, CA, U.S.A., 1981, Seiten 157–166).

**[0004]** Viele Proteasen benötigen Erdalkalimetalle oder Metalle (nachfolgend nur als Metalle bezeichnet) für ihre Wirksamkeit. Die von Metall abhängigen Proteasen werden entweder als Metall aktivierte Proteasen (denen für die Wirksamkeit Metallionen zugesetzt werden müssen) oder Metalloproteininasen (die Metalle als integralen Teil ihres Aufbaus enthalten) angesehen. Im Hinblick auf die erste Gruppe treten die Aktivierung und Stabilisierung von Enzymen durch Metalle häufig bei verschiedenen Proteaseklassen auf, wie beispielsweise Serin- und Cysteinproteinasen.

**[0005]** Die Bedeutung einer Metalloproteinase in kultivierten Endothelzellen für die Sekretion eines bestimmten Metaboliten wurde von R. Ikegawa u.a. in Biochem. Biophys. Res. Comm. 171(2), Seite 669–675 (1990) gezeigt. Dies wurde durch die unterdrückende Wirkung auf diese Sekretion deutlich gemacht, die durch die Zufügung eines für Metalloproteinase spezifischen Inhibitors erkannt wurde. Es war allerdings offensichtlich, dass das Enzym auf den intrazellulären Raum beschränkt war, da keine Inhibitor-Wirkung in einem zellfreien konditionierten Medium erhalten wurde.

**[0006]** Die Wirkungen von Proteasen werden aber viel öfter im Zusammenhang mit dem potentiellen Risiko des Abbaus des betreffenden Enzyms erwähnt.

**[0007]** Die Wirkung von Proteasen in CHO-Zellkulturen ist von M. Satoh u.a., In Vitro Cell Dev. Biol. 26, 1101–1104 (1990) beschrieben worden. Verschiedene Inhibitoren wurden dazu verwendet, die vorhandene proteolytische Aktivität einzuordnen. Aufgrund einer mangelnden Inhibition durch Zugabe von Phosphoramidon wurde geschlossen, dass die Proteasen nicht zu den Metalloproteininasen gehörten, zumindest nicht zu den

nen, die, wie allgemein bekannt, durch dieses Agens gehemmt werden. Die Wirkung der anderen zugesetzten Inhibitoren zeigte, dass die extrazelluläre proteolytische Aktivität von Cysteinproteasen herrührte.

**[0008]** Eine andere Studie beschreibt die proteolytischen Profile für BHK-Zellen bzw. Hybridomakulturen (R. B. Kratje u.a., *J. Biotechnol.* 32, 107–125 (1994)). Bei diesen Zellarten wurde keine Metalloproteaseaktivität gefunden. Es wurde aber eine Aktivität entsprechend den verschiedenen Serinproteasen identifiziert. Es wurde auch festgestellt, dass das Vorhandensein von Proteasen nicht nur von der verwendeten Zellart abhing, sondern auch von den Kulturbedingungen und dem Alter der Kultur.

**[0009]** Aus den oben erwähnten Referaten ist ersichtlich, dass eine stabile Sekretion von Polypeptiden in Zellkulturen durch eine Auswahl von proteolytischen Enzymen gestört werden kann. Für eine wirksame Kontrolle dieser abbauenden Kräfte werden vielfältige Werkzeuge benötigt. Durch eine solche Kontrolle bliebe die Homogenität des Zielproteins besser erhalten. Darüber hinaus würden Proteinadditive oder Substanzen, die endogen durch die für einen proteolytischen Angriff empfindlichen Zellen erzeugt werden, besser geschützt. Alles in allem würde insgesamt eine größere Leistung und Konsistenz des Verfahrens erzielt.

**[0010]** Tokunaga u.a., *Yeast*, Bd. 9 (1993), Seiten 379–387 betrifft die für Chymostatin empfindliche Proteaseaktivität im Zellkulturmedium von *Schizosaccharomyces pombe*, die in das Kulturmedium sekretierte  $\alpha$ -Amylase verdaut. Tokunaga u.a. offenbart nur  $\alpha$ -Amylase von Mäusen. Weiterhin ist *Schizosaccharomyces pombe* eine Spalthefe und  $\alpha$ -Amylase ist ein Enzym, insbesondere ein Kohlenhydrat abbauendes Enzym.

**[0011]** EP-A-2 319 944 von Zymogenetics betrifft die Koexpression eines gewünschten Proteins, z.B. t-PA, Faktor VII oder Faktor IX, in eukaryontischen Zellen und ein Protein, das das gewünschte Protein, z.B. einen Protease-Inhibitor, verarbeitet oder stabilisiert. In diesem Fall wird daher der Protease-Inhibitor *in situ* erzeugt. Dadurch wird die Einführung einer ersten DNA-Sequenz, die das gewünschte Protein kodiert, und mindestens einer zusätzlichen DNA-Sequenz, die das stabilisierende Protein kodiert, notwendig.

**[0012]** WO-A-9002175 von Novo-Nordisk offenbart ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden durch Kultivieren von eukaryontischen Zellen in Gegenwart von verschiedenen Protease-Inhibitoren. Bestimmte Beispiele umfassen den Faktor VIII als Polypeptide, allerdings sind die Protease-Inhibitoren alle auf Serin- und Cysteinproteasen im Allgemeinen gerichtet und Chymotrypsine und spezielle Inhibitoren davon werden nicht erwähnt.

**[0013]** Satoh u.a., *Cytotechnology* 13, 79–88 (1993) berichtet über die Inhibition von Endopeptidasen bei der Herstellung von Pro-Urokinase durch CHO-Zellen. Endopeptidasen werden als zur Klasse der Cysteinproteasen zugehörig angesehen.

**[0014]** Allen u.a., *The Journal of Biological Chemistry* 270, 4797–4804 (1995) betrifft die Zugabe eines Inhibitor-Cocktails, enthaltend Chymostatin, zum Zelllysat von kultivierten rekombinanten CHO-Zellen, die Plasminogenaktivator vom humanen Gewebetyp erzeugen.

**[0015]** In der EP-A-306 968 von Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst. und Teijin wird Aprotinin in einem Zellkulturmedium verwendet, das zur Herstellung eines Deletionsderivats des Faktors VIII verwendet wird. Nach Zugabe von 100 bis 10.000 KIU/ml war das Expressionsniveau zwei- bis dreimal höher als die Kontrolle ohne Zugabe von Aprotinin.

**[0016]** Die Probleme, denen man mit von Metall abhängigen Proteasen und Chymotrypsinen bei der Herstellung von verschiedenen Proteinen begegnet, wurden viel weniger als die Rolle von Cystein- und Serinproteasen geprüft, insbesondere in der Literatur, die Säugetierzellkulturen behandelt. Insbesondere ist das spezifische Problem mit von Metall abhängigen Proteasen und Chymotrypsinen nie zuvor mit dem Faktor VIII behandelt worden.

**[0017]** Es sind verschiedene Lösungen vorgeschlagen worden, um den Abbau von Proteinen und Polypeptiden durch Proteasen zu reduzieren, z.B. aus Plasma stammende sowie rekombinante Faktor VIII-Moleküle. Diese Lösungen sind darauf gerichtet worden, den Einfluss von Serin- und Cysteinproteasen im Allgemeinen zu reduzieren. Serin- und Cysteinproteasen werden als im Blutplasma sowie in Zellkulturen am schädlichsten gehalten. Daher offenbart die WO-A-9 310 143 von Johnson u.a. ein Verfahren zur Wiedergewinnung eines gereinigten und stabilisierten Proteins durch Kontaktieren einer biologischen Faktor VIII enthaltenden Probe mit mindestens einem einer Protease hemmenden oder Protease entfernenden Agens. Das Verfahren ist besonders auf das Hemmen oder Entfernen von Thrombin gerichtet, da der Faktor VIII sehr empfindlich für win-

zige Mengen dieser Serinprotease, die natürlich im Blutplasma enthalten ist, sein soll. Die Protease-Inhibitoren umfassen z.B. Benzamidin, Antithrombin III, Heparin und Hirudin. Die Wirkung des Verfahrens wird nur für aus Plasma stammenden Faktor VIII gezeigt.

**[0018]** Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung für die Probleme zur Verfügung zu stellen, denen man mit Proteasen im Allgemeinen und insbesondere mit Chymotrypsinen in Zellkulturmedien begegnet, die zur Erzeugung von rekombinanten Proteinen und Polypeptiden, insbesondere Faktor VIII, verwendet werden.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0019]** Proteasen neigen im Allgemeinen dazu, die Wirksamkeit von Proteinen und Polypeptiden durch Molekülabbau zu reduzieren. Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung des schädlichen Einflusses von bestimmten Proteasen auf rekombinante Protein- und Polypeptidmoleküle durch Hinzufügen eines Chymotrypsin-Inhibitors zum Zellkulturmedium. Das Vorhandensein des spezifischen Protease-Inhibitors der vorliegenden Erfindung ermöglicht eine verlängerte Erntezeit und beträchtlich höhere Ausbeute bei im Wesentlichen beibehaltener Protein- und Polypeptidaktivität. Die Erfindung betrifft auch ein Zellkulturmedium zum Kultivieren von Zellen, die ein biologisch aktives rekombinantes Polypeptid exprimieren und sekretieren, das einen Chymotrypsin-Inhibitor enthält. Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung von rekombinantem Faktor VIII, erzeugt in einem Zellkulturmedium gemäß dem vorliegenden Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten mit den Symptomen einer Hämophilie A. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung einer Hämophilie A durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge an rekombinantem Faktor VIII, der in einem Zellkulturmedium nach dem vorliegenden Verfahren erzeugt wurde.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0020]** Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, den Einfluss von Chymotrypsinen beim Kultivieren von Wirtszellen zur Erzeugung von rekombinanten Polypeptiden zu reduzieren.

**[0021]** Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, wirksame Kultivierungsbedingungen vorzusehen, um die Wirksamkeit der rekombinanten Polypeptide im Wesentlichen zu erhalten.

**[0022]** Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Halbwertszeit der proteinösen dem Zellkulturmedium zugesetzten Supplamente und anderen Proteine, die durch die Zellen erzeugt und in das Kulturmedium sekretiert werden, zu erhöhen.

**[0023]** Die obigen Aufgaben werden durch die vorliegende Erfindung erfüllt, die ein Verfahren zur Erzeugung eines biologisch wirksamen rekombinanten humanen Polypeptids in einem Zellkulturmedium betrifft, was die Expression und Sekretion des Polypeptids ermöglicht, wobei ein Chymotrypsin-Inhibitor dem Zellkulturmedium zugesetzt wird.

**[0024]** Die vorliegende Erfindung betrifft weiter ein Zellkulturmedium zum Kultivieren von Zellen, die ein biologisch wirksames, rekombinantes humanes Polypeptid exprimieren und sekretieren, wobei das Zellkulturmedium einen Chymotrypsin-Inhibitor enthält.

**[0025]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Kultivieren von Zellen, die ein rekombinantes humanes Polypeptid in einem Zellkulturmedium exprimieren, wobei das Zellkulturmedium einen Chymotrypsin-Inhibitor enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zum Erzeugen eines rekombinanten humanen Polypeptids durch Kultivieren von Zellen, die das Polypeptid durch Kultivieren von Zellen exprimieren, die ein rekombinantes humanes Polypeptid in einem Zellkulturmedium exprimieren, das einen Chymotrypsin-Inhibitor enthält, und zum Wiedergewinnen des Polypeptids.

**[0026]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben festgestellt, dass bestimmte Protease-Inhibitoren überraschenderweise eine positive Auswirkung auf die Aktivität von Polypeptiden während der Kultivierung von rekombinante Polypeptide exprimierenden Wirtszellen haben. Das Vorhandensein dieser Inhibitoren führt zu einer gesteigerten Produktivität. Auf diese Weise kann die Polypeptidausbeute bei im Wesentlichen beibehaltener Aktivität und/oder Homogenität beträchtlich erhöht werden.

**[0027]** Die Chymotrypsin-Inhibitoren sind zweckmäßig Verbindungen, die eine hydrophobe Komponente ent-

halten. Die Chymotrypsine unterscheiden sich von anderer Serinprotease durch das Vorhandensein einer tiefen Kluft an der Wirkstelle. Diese tiefe Kluft bedingt die Substratspezifität, die bei Chymotrypsinen angetroffen wird. Daher ist die hydrophobe Komponente passenderweise eine aromatische, heterocyclische aromatische oder andere umfangreiche Seitengruppe. Heterocyclische aromatische Seitengruppen betreffen aromatische Verbindungen, bei denen ein Element, das nicht Kohlenstoff ist, im aromatischen Ring vorhanden ist. Beispiele sind Pyridin, Pyrrol, Furan und Thiopen. Weiterhin betrifft in der vorliegenden Erfindung der Begriff hydrophobe umfangreiche Seitengruppe verschiedene andere nicht polare Ringstrukturen, wie beispielsweise Monocycloalkane, z.B. Cyclohexan, Dicycloalkane und Polycycloalkane, oder substituierte Derivate von einer dieser Strukturen.

**[0028]** Chymotrypsine sind Serinproteasen. In der vorliegenden Erfindung betreffen Chymotrypsine Chymotrypsine und chymotrypsinartige Proteasen. Chymotrypsinartige Proteasen betreffen hier Proteasen mit einer Funktion und/oder einem chemischen Aufbau, welcher stark der bzw. dem von Chymotrypsinen ähnelt. Nachfolgend wird Chymotrypsin verwendet, um Chymotrypsine sowie chymotrypsinartige Proteasen zu bezeichnen. Eine Verbindung zwischen Chymotrypsin und einer Metalloprotease ist in Borivoj Keil, „Specificity of Proteolysis“ (siehe oben), Tabelle 11, Seiten 36–39 gezeigt. In einer Einordnung nach den bevorzugten Sequenzen von Aminosäuren an der Spaltstelle wird Chymotrypsin zusammen mit anderen Proteasen eingeteilt, die bei LYL spalten (Leucin, Tyrosin, Leucin). Zu den anderen Enzymen dieser Gruppe gehört eine Kollagenase, ein Enzym, das üblicherweise als Metalloprotease bezeichnet wird.

**[0029]** Der Chymotrypsin-Inhibitor kann natürlich oder synthetisch sein und strukturell mit dem natürlichen Substrat der Protease verwandt sein. Der Chymotrypsin-Inhibitor enthält zweckmäßig eine hydrophobe Komponente. Die Funktionalität einer hydrophoben Komponente ist eine Eigenschaft, die mit den spezifischen Inhibitoren für das Zink-Metallocendo-Peptidase-Thermolysin, das im vorangehenden Absatz erwähnt wird, geteilt wird. Der Chymotrypsin-Inhibitor wird passenderweise aus den natürlichen Verbindungen Chymostatin A, Chymostatin B oder Chymostatin C oder einer Mischung davon ausgewählt. Üblicherweise ist Chymostatin eine Mischung, die alle drei Chymostatine enthält, wobei Chymostatin A den Hauptanteil bildet. Alle Chymostatine enthalten einen Rest der ungewöhnlichen Aminosäure  $\alpha$ -(2-Iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl)-S-glycin. Der Aufbau dieser natürlichen Verbindungen sind N-[(S)-1-Carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl- $\alpha$ -N-[2-iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl]-S-glycyl-L-leucyl-phenylalaninal (Chymostatin A), N-[(S)-1-Carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl- $\alpha$ -N-[2-iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl]-S-glycyl-L-valyl-phenylalaninal (Chymostatin B) und N-[(S)-1-Carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl- $\alpha$ -N-[2-iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl]-S-glycyl-L-isoleucyl-phenylalaninal (Chymostatin C).

**[0030]** Die Konzentration der Verbindung, die Chymotrypsine hemmt, kann im Bereich von etwa 0,001  $\mu$ g/l bis etwa 100 mg/l, vorzugsweise im Bereich von 0,01  $\mu$ g/l bis 25 mg/l und bevorzugt im Bereich von 0,1  $\mu$ g/l bis zu 100  $\mu$ g/l liegen. Die oben angegebenen Zahlen entsprechen einer Konzentration der Verbindung, die die Chymotrypsine im Bereich von etwa 1,67 pM bis etwa 167  $\mu$ M, geeigneterweise im Bereich von 16,7 pM bis 41,7  $\mu$ M und vorzugsweise im Bereich von 167 pM bis 167 nM hemmt.

**[0031]** Die Wirtszellen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können prokaryontische oder eukaryontische, geeigneterweise eukaryontische, Zellen sein. Die Wirtszellen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können Säugetier-, Bakterien-, Pilz- oder Insektenzellen sein. Die Zellen sind zweckmäßig Säugetierzellen oder Insektenzellen, vorzugsweise Säugetierzellen. Die Insektenzellen können Sf-9- oder SF-21-Zellen sein. Die Säugetierzellen können Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), Babyhamsternierenzellen (BHK-Zellen), COS-Zellen oder Hybridomazelle, vorzugsweise CHO-Zellen, sein.

**[0032]** Das Zellkulturmedium kann Serum enthalten. In geeigneter Weise ist aber das Zellkulturmedium ein Medium mit wenig Serum und vorzugsweise ein serumfreies Medium. Das Zellkulturmedium kann weiter ein oder mehr zugesetzte Proteine, wie beispielsweise humanes Serumalbumin (HSA), Rinderserumalbumin (BSA), Insulin, Wachstumsfaktoren, IGF-1, IGF-2, Wachstumshormon, Neurotrophine, Leptin, Transferrin und den von-Willebrand-Faktor (vWF) enthalten. Wenn dem Zellkulturmedium in der vorliegenden Erfindung Proteine zugesetzt werden, werden solche Proteine vorzugsweise durch rekombinante DNA-Verfahren erzeugt. Bevorzugt ist das Zellkulturmedium ein proteinfreies Medium, d.h. frei von zugesetzten proteinösen Substanzen. Dies macht die Herstellung eines Polypeptids mit sehr hoher spezifischer Wirksamkeit möglich. Auf diese Weise wird das Medium gut definiert und das Risiko des Einführens von Kontaminanten, wie beispielsweise Mycoplasma, Bakteriophagen, Viren und Toxinen, fast ausgeschaltet. Außerdem wird die nachfolgende Reinigung der erzeugten Polypeptidmoleküle erleichtert.

**[0033]** Das Zellkulturmedium kann auf einem vollständigen Medium oder einem Nährbasalmedium, das durch

eine Anzahl von Komponenten ergänzt ist, beruhen. Beispiele für geeignete vollständige Medien sind verschiedene ASF-Medien, die von Ajinomoto of Japan vertrieben werden, Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM), Eagles Minimum Essential Medium, Hams Medium F-12 und RPMI-1640 Medium. Verschiedene Kombinationen von DMEM und Hams F-12, die beide von GIBCO, Renfrewshire, Schottland, vertrieben werden, sind auch geeignete vollständige Medien zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Ein ergänztes Basalmedium kann durch Zugabe von Komponenten zum Nährbasalmedium gemäß den Standardverfahren zur Herstellung von Zellkulturmedien hergestellt werden.

**[0034]** Supplemente, die dem Zellkulturmedium zugesetzt werden, sind für die vorliegende Erfindung nicht kritisch und können Kombinationen von denen im Stand der Technik bekannten sein, die für die betreffenden Zellen geeignet sind. Beispiele für Supplemente, die verwendet werden können, umfassen Insulin, Transferrin, Ascorbinsäure, Ethanolamin, Glutamin und Natriumselenit.

**[0035]** Der Protease-Inhibitor kann dem Zellkulturmedium einmal, mehrere Male oder kontinuierlich über die Kultivierungszeit hinweg zugesetzt werden. Die Inhibitoren der vorliegenden Erfindung werden geeigneterweise dem Zellkulturmedium bei einer Änderung des Mediums zugesetzt. Der Protease-Inhibitor kann eine Mischung aus einem Inhibitor aus von Metall abhängigen Proteasen und einem Chymotrypsin-Inhibitor sein. Der Protease-Inhibitor kann auch eine Kombination aus einem von Metall abhängigen Protease-Inhibitor und einem Chymotrypsin-Inhibitor sein, zugesetzt in willkürlicher Folge.

**[0036]** In der vorliegenden Erfindung betreffen Polypeptide Proteine und Oligopeptide mit mindestens 20 Aminosäuren in der Kette. Die Anzahl der Aminosäuren des gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugten Polypeptids liegt geeigneterweise im Bereich von 30 bis 4.500 Aminosäuren und vorzugsweise im Bereich von 40 bis 3.000 Aminosäuren. Polypeptide, die gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt werden können, umfassen Polypeptide, die koagulative, antikoagulative und fibrinolytische Aktivitäten zeigen, Membran gebundene und nukleäre Rezeptoren und Metabolismus regulierende humorale Faktoren (Hormone). Spezifische Beispiele für Polypeptide, die gemäß dem vorliegenden Verfahren erzeugt werden können, sind Faktor VIII, Faktor V, Faktor VII, Faktor IX, tPA, Prostaglandinrezeptoren, Glucocorticoidrezeptoren, durch Peroxisomproliferatoren aktivierte Rezeptoren (PPARs), Faktoren, die das Wachstum und das Überleben der Zellen fördern, Interleukin, Interferon und IGF-Bindungsproteine (IGFBP). Die Polypeptide können volle Länge aufweisen, d.h. die Aminosäuresequenz ist mit der entsprechenden, in Säugetieren im Allgemeinen und im Menschen im Besonderen gefundenen Sequenz identisch. Die Polypeptide können auch Deletionsderivate der Polypeptide voller Länge sein, bei denen eine oder mehr Aminosäuren fehlen. In der vorliegenden Erfindung ist das Polypeptid vorzugsweise der Faktor VIII.

**[0037]** In der vorliegenden Erfindung kann der Faktor VIII, der durch rekombinante DNA-Verfahren erzeugt wurde, ein Faktor VIII voller Länge oder vorzugsweise ein Deletionsderivat des Faktors VIII voller Länge mit Koagulationsaktivität sein. Unter Deletionsderivat soll hier der Koagulationsfaktor VIII verstanden werden, bei dem die ganze oder ein Teil der B-Domäne fehlt, während die Koagulationsaktivität erhalten bleibt. Die übrigen Domänen sind in geeigneter Weise durch einen Aminosäure-Linker verbunden. Beispiele für verschiedene Linker-Konstruktionen sind in P. Lind u.a., Eur. J. Biochem., Bd. 232 (1995), Seite 19–27 angegeben. Der Aufbau und die Biochemie von Produkten des rekombinanten Faktors VIII sind allgemein von Kaufman in Trends in Biotechnology, 9, Seiten 353–359 (1991) und Hematology, 63, Seiten 155–65 (1991) beschrieben worden.

**[0038]** Der Faktor VIII voller Länge, der in menschlichem Plasma vorhanden ist, hat eine Molekularmasse von etwa 300 kDa. Faktor-VIII-Konzentrate, die von einem solchen Plasma stammen, enthalten mehrere fragmentierte vollständig aktive Faktor-VIII-Formen, wie von Andersson u.a., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, Seiten 2979–83 (Mai 1986) beschrieben. Die kleinste aktive Form hat eine Molekularmasse von etwa 170 kDa und besteht aus zwei Ketten von etwa 90 kDa und etwa 80 kDa, die durch Metallion(en) zusammengehalten werden. Bezug wird hier auf die EP-A-0 197 901 (Pharmacia AB) genommen. Der biologisch aktive Faktor VIII, der gemäß der vorliegenden Erfindung erzeugt wurde, hat daher zweckmäßig eine Molekularmasse im Bereich von etwa 170 kDa bis etwa 300 kDa.

**[0039]** Pharmacia AB, Stockholm, Schweden hat ein rekombinantes Faktor-VIII-Produkt entwickelt, das der in etwa 170 kDa Plasmafaktor-VIII-Form in therapeutischen Faktor-VIII-Konzentraten entspricht. Das verkürzte rekombinante Faktor VIII-Molekül wird mit r-VIII SQ bezeichnet und durch Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) in einem Zellkulturverfahren in serumfreiem Medium erzeugt. Der Aufbau und die Biochemie von r-VIII SQ ist in der WO-A-9 109 122 (Pharmacia AB) beschrieben worden. In der vorliegenden Erfindung ist das Deletionsderivat besonders bevorzugt der rekombinante Faktor VIII SQ (r-VIII SQ).

**[0040]** Der in einem Zellkulturmedium gemäß dem vorliegenden Verfahren erzeugte rekombinante Faktor VIII kann zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten mit Symptomen einer Hämophilie A verwendet werden. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Hämophilie A durch Verabreichen einer therapeutische wirksamen Menge an rekombinantern Faktor VIII, das in einem Zellkulturmedium gemäß dem vorliegenden Verfahren erzeugt wurde.

**[0041]** Der pH-Wert des Zellkulturmediums liegt zweckmäßig im Bereich von etwa 6 bis etwa 8. Die Osmolalität des Zellkulturmediums liegt zweckmäßig im Bereich von etwa 280 bis etwa 400 Milliosmol.

**[0042]** Das Zellkulturverfahren kann ein Suspensionskulturverfahren, Monoschichtkulturverfahren, wie beispielsweise ein Rollflaschenverfahren, Mikroträger- oder Hohlfaserverfahren, vorzugsweise ein Suspensionskulturverfahren, sein.

**[0043]** Die Funktionsweise des vorliegenden Verfahrens kann kontinuierlich oder losweise sein.

**[0044]** Die folgenden Beispiele dienen nur zur Veranschaulichung und sollen in keiner Weise den Umfang der vorliegenden Erfindung, der durch die beigefügten Ansprüche definiert wird, einschränken.

**[0045]** Die prozentualen Angaben und Teile sind auf das Gewicht bezogen, wenn nicht anders angegeben.

## VERSUCHE

### Herstellung von rekombinantem Faktor VIII

**[0046]** Die Herstellung von rekombinantem Faktor VIII SQ (r-VIII SQ) wurde im Wesentlichen wie im Patent WO-A-9 109 122 von Pharmacia & Upjohn, Beispiel 1 bis 3, beschrieben durchgeführt. Eine CHO-Zelllinie (DG44) mit einem Mangel an DHFR wurde mit einem das r-VIII SQ-Gen enthaltenden Expressionsvektor und einem das Dihydrofolat-Reduktase-Gen enthaltenden Expressionsvektor elektroporiert. Nach einer Auswahl auf selektiven Medien wurden die überlebenden Kolonien durch das Wachstum in schrittweise steigenden Mengen an Methotrexat amplifiziert. Der Überstand aus den sich ergebenden Kolonien wurde einzeln auf Faktor-VIII-Aktivität hin gescreent. Ein Herstellungsklon wurde ausgewählt und dieser anschließend an ein serumfreies Suspensionswachstum in einem bestimmten Medium angepasst.

### Material

**[0047]** Das in den Experimenten verwendete Chymostatin enthielt Chymostatin A, Chymostatin B und Chymostatin C, wobei Chymostatin A den Hauptteil bildete. Die Protease-Inhibitoren waren alle von analytischer Qualität und wurden von Sigma, St. Louis, USA erhalten.

### Analytische Verfahren

**[0048]** Die Aktivität des Koagulationsfaktors VIII wurde durch einen chromogenen Substratassay (Coatest Factor VIII, Chromogenix AB, Mölndal, Schweden) bewertet. Der aktivierte Faktor X (Xa) wird über den intrinsischen Weg erzeugt, bei dem der Faktor VIII als Cofaktor wirkt. Der Faktor Xa wird dann durch die Verwendung eines synthetischen chromogenen Substrats, S-2222, in Gegenwart eines Thrombin-Inhibitors I-2581 bestimmt, um die Hydrolyse des Substrats durch Thrombin zu verhindern. Die Reaktion wird mit Säure angehalten, und das VIII:C, das im Verhältnis zur Freisetzung von pNA (para-Nitroanilin) steht, wird photometrisch bei 450 nm gegenüber einem Reaktionsblindwert bestimmt. Die Einheit des Faktors VIII:C wird in internationalen Einheiten (IU) ausgedrückt, wie durch den von der WHO eingerichteten Internationalen Standard für Konzentrate (IS) definiert ist.

**[0049]** Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde bei mehreren Gelegenheiten, wie in den Tabellen I-IV offenbart, bestimmt, um nachzuprüfen, dass die zugesetzten Inhibitoren über den ganzen Herstellungszeitraum hinweg keine negative Wirkung auf das Überleben der Zellen hatten. Die Analysen wurden nach dem Färben der Zellen mit Erythrosin B in einer Bürker-Kammer oder mittels Durchflusszytometrie erstellt. Der Anteil der lebensfähigen Zellen wurde im Verhältnis zur Zellgesamtzahl (%) berechnet.

### Beispiel 1

**[0050]** Dieses Beispiel soll die Wirksamkeit der vorliegenden Erfindung im Vergleich zu verschiedenen ande-

ren Protease-Inhibitoren veranschaulichen.

**[0051]** CHO-Zellen wurden unter Wachstumsbedingungen in Spinner Flasks in einem vollständigen Kulturmedium, wie beispielsweise ASF, oder einer Mischung aus DMEM und Hams Medium F-12 kultiviert. Anfänglich betrug die Temperatur 37°C und der Zellgehalt etwa  $0,7 \times 10^6$  Zellen/ml Zellkulturmedium. Der Tag 0 wurde als Tag definiert, an dem die Herstellung begann. Die Temperatur wurde auf 34°C gesenkt. Am Tag 3 wurde das Kulturmedium durch ein frisches Medium mit 0,5 mM Buttersäure ersetzt, und der Zellgehalt wurde auf etwa  $3 \times 10^6$  Zellen/ml Zellkulturmedium eingestellt. Am Tag 4 wurde eine Suspension der Produktionszellen für die kontinuierliche Kultivierung auf Polypropylenröhren aliquotiert und die Protease-Inhibitoren wurden zugesetzt. Am Tag 5 wurden das Medium ersetzt und die Protease-Inhibitoren zugesetzt. Der Austausch des Mediums wurde am Tag 6, Tag 7, Tag 10 (akkumulierter Wert nach 72 Stunden) durchgeführt. Am Tag 11 wurden die Versuche gestoppt. Eine Western Blot Analyse zeigte, dass die Qualität des hergestellten Faktors im Wesentlichen unbeeinflusst war. Die Lebensfähigkeit war allgemein hoch. Der niedrigste Wert betrug 90% und wurde am Herstellungstag 11 für die Kontrolle und Aprotinin erhalten.

**[0052]** Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

TABELLE I

Faktor VIII:C im Zellkulturmedium, enthaltend Protease-Inhibitoren gemäß der Erfindung

| Test | Inhibitor,<br>Konzentration             | Tag 6<br>IU/ml | Tag 6,<br>%<br>IU/ml | Tag 7<br>IU/ml | Tag 7,<br>%<br>IU/ml | Tag 10,<br>IU/ml | Tag 10,<br>%<br>IU/ml | Tag 11,<br>IU/ml | Tag 11,<br>%<br>IU/ml | Akkumuliert,<br>IU/ml | Akkumuliert,<br>% |
|------|---|----------------|----------------------|----------------|----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1    | Kontrolle                               | 2,93           | 100                  | 7,2            | 100                  | 24,5             | 100                   | 12,5             | 100                   | 47,1                  | 100               |
| 4    | Chymostatin,<br>1,04 nM<br>(0,625 µg/l) | 5,48           | 187                  | 12,5           | 174                  | 33,7             | 138                   | 15,7             | 126                   | 67,4                  | 143               |
| 5    | Chymostatin,<br>10,4 nM (6,25<br>µg/l)  | 6,80           | 232                  | 10,6           | 148                  | 38,5             | 157                   | 10,7             | 86                    | 66,6                  | 141               |

TABELLE II

Faktor VIII:C im Zellkulturmedium, enthaltend Protease-Inhibitoren gemäß der Erfindung

| Test | Inhibitor,<br>Konzentration | Tag 6<br>IU/ml<br>% | Tag 7<br>IU/ml<br>% | Tag 10,<br>IU/ml<br>% | Tag 11,<br>IU/ml<br>% | Akkumuliert,<br>% | Akkumuliert,<br>% |
|------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 1    | Kontrolle                   | 2,93                | 100                 | 7,2                   | 100                   | 24,5              | 100               |
| 2    | Aprotinin,<br>0,3 µM        | 3,83                | 131                 | 8,52                  | 118                   | 24,5              | 100               |
| 3    | Aprotinin,<br>3,0 µM        | 3,96                | 135                 | 8,42                  | 117                   | 24,1              | 124               |
| 4    | Chloroquin,<br>0,625 µM     | 4,19                | 143                 | 9,39                  | 130                   | 26,5              | 108               |
| 5    | Chloroquin,<br>6,25 µM      | 3,75                | 128                 | 7,19                  | 100                   | 25,5              | 104               |
| 6    | L-Histidin,<br>0,52 mM      | 3,17                | 108                 | 6,22                  | 86                    | 23,1              | 94                |
| 7    | L-Histidin,<br>5,2 mM       | 2,17                | 74                  | 4,64                  | 64                    | 8,16              | 33                |

TABELLE III

Zellebensfähigkeit in Zellkulturmedium, enthaltend Protease-Inhibitoren gemäß der Erfindung

| Test | Inhibitor,<br>Konzentration             | Tag 6, % | Tag 7, % | Tag 10, % | Tag 11, % |
|------|---|----------|----------|-----------|-----------|
| 1    | Kontrolle                               | 97,4     | 97,5     | 91,4      | 90,7      |
| 4    | Chymostatin,<br>1,04 nM<br>(0,625 µg/l) | 98,3     | 98,0     | 94,9      | 93,6      |
| 5    | Chymostatin,<br>10,4 nM (6,25<br>µg/l)  | 95,3     | 95,9     | 91,6      | 94,0      |

TABELLE IV

Zellebensfähigkeit in Zellkulturmedium, enthaltend Protease-Inhibitoren nicht gemäß der Erfindung

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

**[0053]** Wie aus der Tabelle I ersichtlich, steigert das Vorhandensein von Protease-Inhibitoren gemäß der vorliegenden Erfindung dramatisch die Möglichkeit, den Faktor VIII:C beizubehalten. Wie aus der Tabelle II ersichtlich, hat das Vorhandensein von verschiedenen anderen Protease-Inhibitoren einen sehr geringen oder sogar negativen Effekt auf den Faktor VIII:C. Aus der Tabelle III ist ersichtlich, dass die erhöhte Produktion von Faktor VIII, wie in der Tabelle I veranschaulicht, nicht einer erhöhten oder verringerten Zellebensfähigkeit zugeschrieben werden kann. Weiter ist aus der Tabelle IV ersichtlich, dass die mangelnde Wirkung auf die Produktion von Faktor VIII, wie in der Tabelle II veranschaulicht, kein Effekt ist, der einer erniedrigten Zellebensfähigkeit entgegenwirkt.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten B-Domänen deletierten Derivats des humanen Volllängen-Faktors VIII mit beibehaltener Gerinnungsaktivität in einem Zellkulturmedium unter Ermöglichung der Expression und Sekretion des Polypeptids, wobei ein Chymotrypsin-Inhibitor, enthaltend  $\alpha$ -(2-Iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl)-S-glycin, während der Kultivierungsdauer zu dem Zellkulturmedium gegeben wird und wobei die kultivierte Zelle eine Säugerzelle ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Chymotrypsin-Inhibitor aus der Gruppe bestehend aus Chymostatin A, Chymostatin B, Chymostatin C und einer Mischung davon ausgewählt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Konzentration des Chymotrypsin-Inhibitors zwischen 0,1 und 100  $\mu$ g/l liegt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Säugerzelle aus der Gruppe bestehend aus Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), Hamsternierenzellen (BHK-Zellen), COS-Zellen und Hybridoma-Zellen ausgewählt ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Zellkulturmedium ein serumfreies Medium ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das B-Domänen deletierte Derivat des Faktors VIII der rekombinante Faktor VIII SQ (r-VIII SQ) ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen