

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 343

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2001 - 463

(22) Přihlášeno: 16.08.1994

(30) Právo přednosti:
17.08.1993 US 1993/108016

(40) Zveřejněno: 13.03.1996

(Věstník č. 3/1996)

(47) Uděleno: 05.12.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12.02.2003
(Věstník č. 2/2003)

(86) PCT číslo: PCT/US94/09257

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 95/005465

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 N 15/12

C 07 K 14/505

A 61 K 38/18

(73) Majitel patentu:

KIRIN-AMGEN, INC., Lucerne, CH;

(72) Původce vynálezu:

Elliot Steven G., Newbury Park, CA, US;

Byrne Thomas E., Arlington, VA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Analog humánního erythropoietinu a jeho
použití, sekvence DNA, eukaryontní hostitelská
buňka a farmaceutický prostředek**

(57) Anotace:

Analog humánního erythropoietinu, zahrnující adici jedné nebo více aminokyselin ke karboxylovému konci erythropoietinu, přičemž v adovaných aminokyselinách je obsaženo alespoň jedno místo pro glykosylaci. Použití tohoto analogu pro výrobu farmaceutického prostředku pro zvyšování hematokritu u pacienta a tento farmaceutický prostředek. Sekvence DNA kódující tento analog a eukaryontní hostitelská buňka transfekovaná touto sekvencí DNA způsobem umožňujícím hostitelské buňce exprimovat výše uvedený analog.

CZ 291343 B6

Analog humánního erythropoietinu a jeho použití, sekvence DNA, eukaryotní hostitelská buňka a farmaceutický prostředek

5 Oblast techniky

Vynález se týká analogů humánního erythropoietinu a jejich použití pro výrobu léčiv, sekvencí DNA, které kódují tyto analogy, eukaryotních hostitelských buněk transfekovaných těmito sekvencemi DNA a farmaceutického prostředku na bázi výše uvedených analogů erythropoietinu.

10

Dosavadní stav techniky

Erythropoietin (EPO) je glykoproteinový hormon, který se podílí na maturaci erythroidních progenitorových buněk na erythrocyty. Jedná se o důležitý hormon regulující hladinu červených krvinek v oběhovém systému. Přírodní erythropoietin je produkován v játrech během života plodu a v ledvinách dospělých, cirkuluje krví a stimuluje produkci červených krvinek v kostní dřeni. Anémie je téměř vždy důsledkem selhání ledvin projevujícího se sníženou produkcí erythropoietinu v ledvinách. Zjistilo se, že rekombinantní erythropoietin vyrobený technikami genetického inženýrství, tj. expresí proteinového produktu z hostitelské buňky transformované genem kódujícím erythropoietin je účinný při léčbě anémie vyvolané chronickým selháním ledvin.

V moči člověka je normálně přítomna nízká koncentrace erythropoietinu, zatímco v moči pacientů trpících aplastickou anémií je hladina erythropoietinu (Miyake et al., J. Biol. Chem. 252, 5558 (1977)) bylo jako výchozí látky použito moči pacientů trpících aplastickou anémií. Až dosud se však urinární erythropoietin nestal užitečným z terapeutického hlediska.

Identifikace, klonování a exprese genů kódujících erythropoietin je popsána v patentu US 4 703 008 (Lin). Popis způsobu purifikace rekombinantního erythropoietinu z buněčného média je popsán v patentu US 4 667 016 (Lai et al.). Výše uvedené dvě citace jsou zde uvedeny náhradou za přenesení jejich celého obsahu do popisu tohoto vynálezu. Exprese a izolace biologicky aktivního rekombinantního erythropoietinu ze savčích hostitelských buněk obsahujících erythropoietinový gen v rekombinantním plazmidu umožnila poprvé získat větší množství erythropoietinu vhodného pro terapeutické aplikace. Kromě toho, znalost sekvence genu a dostupnost větších množství purifikovaného proteinu vedla k lepšímu porozumění mechanismu účinku tohoto proteinu.

Mnohé buněčné povrchové proteiny a sekretorové proteiny produkováné eukaryotními buňkami jsou modifikovány jednou nebo více oligosacharidovými skupinami. Tato modifikace, která je označována názvem glykosylace, může dramaticky ovlivnit fyzikální vlastnosti proteinů a může být také důležitá pro stabilitu, sekvenci a subcelulární lokalizaci proteinu. Vhodná glykosylace může mít rozhodující význam pro biologickou účinnost. Je skutečností, že některé geny z eukaryotních organismů, pokud jsou exprimovány v bakteriích (například E. coli), kterým chybí buněčné procesy pro glykosylaci proteinů, poskytují proteiny, které po izolaci vykazují jen malou účinnost nebo jsou úplně neúčinné, v důsledku toho, že nejsou glykosylovány.

Ke glykosylaci dochází na specifických místech hlavního řetězce polypeptidu a obvykle se jedná o dva různé typy: O-vázané oligosacharidy jsou připojeny k serinovým nebo threoninovým zbytkům, zatímco N-vázané oligosacharidy jsou připojeny k asparaginovým zbytkům, kde jsou součástí sekvence Asn-X-Ser/Thr, kde X představuje jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou prolinu. Struktury N-vázaných a O-vázaných oligosacharidů a cukerných zbytků, které se vyskytují u obou typů, jsou různé. Jedním typem cukru, který se obvykle vyskytuje u obou těchto typů, je kyselina N-acetylneuraminová (dále označovaná názvem kyselina sialová). Kyselina

sialová tvoří obvykle terminální zbytek jak N-vázaného, tak O-vázaného oligosacharidu a díky svému negativnímu náboji může propůjčovat glykoproteinu kyselé vlastnosti.

Jak humánní erythropoietin izolovaný z moči, tak rekombinantní erythropoietin (exprimovaný v savčích buňkách) s aminokyselinovou sekvencí 1–165 humánního erythropoietinu obsahuje tři N-vázané a jeden O-vázaný oligosacharidový řetězec, které dohromady činí asi 40 % celkové molekulové hmotnosti glykoproteinu. N-vázaná glykosylace se vyskytuje u asparatinových zbytků umístěných v polohách 24, 38 a 83, zatímco O-vázaná glykosylace je umístěna na serinovém zbytku v poloze 126 [Lai et al., J. Biol. Chem. 261, 3 116 (1986); Broudy et al., Arch. Biochem. Biophys. 265, 329 (1988)]. Bylo ukázáno, že oligosacharidové řetězce jsou modifikovány terminálními zbytky kyseliny sialové. Enzymatické zpracování glykosylovaného erythropoietinu za účelem odstranění všech zbytků kyseliny sialové, se projevuje ztrátou účinnosti in vivo, ale neovlivní účinnost in vitro [Lowy et al., Nature 185, 102 (1960); Goldwasser et al., J. Biol. Chem. 249, 4 202 (1974)]. Toto chování bylo vysvětleno rychlým vymizením asialoerythropoietinu z oběhu při interakci s hepatickým proteinem, který váže asialoglykoprotein [Morrell et al., J. Biol. Chem. 243, 155 (1968); Briggs et al., Am. J. Physiol. 227, 1 385 (1974); Ashwell et al., Methods Enzymol 50, 287 (1978)]. Erythropoietin vykazuje tedy biologickou účinnost in vivo pouze v tomto případě, když je sialylován, čímž se zabrání jeho vazbě na hepatický vazebný protein.

Úloha jiných složek v oligosacharidových řetězcích erythropoietinu není dobře definována. Zjistilo se, že částečně deglykosylovaný erythropoietin vykazuje podstatně sníženou účinnost in vivo ve srovnání s glykosylovanou formou, ale zachovává si svou účinnost in vitro [Dordal et al., Endocrinology 116, 2293 (1985); Lin, výše citovaný patent]. V jiné studii všech bylo konstatováno, že odštěpení N-vázaných nebo O-vázaných oligosacharidových řetězců, jednotlivě nebo dohromady, mutagenézí asparaginových nebo serinových zbytků, které představují glykosylační místa, výrazně snižuje in vitro účinnost modifikovaného erythropoietinu produkovaného v savčích buňkách [Dube et al., J. Biol. Chem. 263, 17516 (1988)].

Glykoproteiny, jako je erythropoietin, je možno rozdělovat na formy s různým nábojem za použití takových technik, jako je izoelektrická fokusace (IEF). Několik skupin vědců publikovalo IEF studie vztahující se k surovým nebo zčásti purifikovaným erythropoietinovým přípravkům [Lukowski et al., J. Biochem. 50, 909 (1972); Shelton et al., Biochem. med. 12, 45 (1975); Fuhr et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 930 (1981)]. Pomocí IEF byly při těchto studiích identifikovány nejvýše tři nebo čtyři frakce s erythropoietinovou účinností a žádná z nich nebyla charakterizována, pokud se týče obsahu uhlohydrátů. Kromě nebyla provedena žádná korelace mezi izoelektrickými body těchto frakcí a jejich biologickou účinností.

Při purifikaci erythropoietinu izolovaného z humánní moči (Miyake et al., výše uvedená citace) bylo zjištěno, že dvě frakce erythropoietinu izolované pomocí chromatografie na hydroxylapatitu a označené symboly II a IIIa, vykazují podobnou specifickou účinnost. Následující analýza uhlohydrátů ve frakcích II a IIIa ukázala, že frakce II obsahuje vyšší průměrný obsah kyseliny sialové, než frakce IIIa (Dordal et al., výše uvedená citace).

Úkolem tohoto vynálezu je získat oddělené a izolované izoformy erythropoietinu s definovaným obsahem kyseliny sialové a s definovanou biologickou účinností. Tyto izoformy by měly být terapeuticky užitečné při použití ve formě farmaceutických prostředků.

50 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je analog humánního erythropoietinu zahrnující adici jedné nebo více aminokyselin ke karboxylovému konci erythropoietinu, přičemž v adovaných aminokyselinách je obsaženo alespoň jedno místo pro glykosylaci.

Ve výhodném provedení analog humánního erythropoietinu podle vynálezu zahrnuje adici peptidového fragmentu získaného z karboxyterminální části humánního chorionického gonadotropinu, přičemž tento fragment je připojen ke karboxylovému konci erythropoietinu.

5

Jako konkrétní provedení analogu humánního erythropoietinu podle vynálezu je možnou věst provedení zvolená ze souboru sestávající z

10 a) humánního erythropoietinu, k jehož karboxylovému konci je připojena aminokyselinová sekvence Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln;

b) analogu charakterizovaného v odstavci a), který dále obsahuje Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO; a

15 c) analogu charakterizovaného v odstavci a), který dále obsahuje Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰-EPO.

Předmětem vynálezu je také sekvence DNA kódující analog humánního erythropoietinu popsany výše.

20

Dalším předmětem vynálezu je eukaryotní hostitelská buňka transfekovaná sekvencí DNA uvedeno výše způsobem umožňujícím hostitelské buňce exprimovat analog humánního erythropoietinu.

25 Předmětem vynálezu je dále také farmaceutický prostředek, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje terapeuticky účinné množství výše uvedeného analogu erythropoietinu spolu s farmaceuticky vhodným ředidlem, adjuvantem nebo nosičem.

30 Konečně je předmětem vynálezu také použití terapeuticky účinného množství výše uvedeného analogu erythropoietinu pro výrobu farmaceutického prostředku pro zvyšování hematokritu u pacienta.

Přehled obrázků na výkresech

35

Obr. 1 ukazuje analytický izoelektrický fokusační gel, na němž je provedena separace izoform rekombinantního erythropoietinu. Gelové dráhy 1 až 11 ukazují izoformy od méně kyselých (vyšší hodnota pI) v dráze 1 ke kyslejší (nižší hodnota pI) v dráze 11. V drahách ležících u pravého a levého okraje je též obsažen purifikovaný rekombinantní erythropoietin obsahující směs izoform 9 až 14.

40

Na obr. 2 je znázorněn vztah mezi počtem zbytků kyseliny sialové v izoformě erythropoietinu a specifickou účinností této izoformy in vivo vyjádřenou v jednotkách/mg erythropoietinového polypeptidu. Na obr. 2A je znázorněna koncentrace každé izoformy erythropoietinu zjištěná Bradfordovým stanovením proteinů. Na obr. 2B je tato koncentrace stanovena měřením absorpance při 280 nm a na obr. 2C je tato koncentrace stanovena metodou RIA.

45

Obr. 3 ukazuje analytický izoelektrický fokusační gel s definovanými směsí izoform rekombinantního erythropoietinu připravenými chromatografií na anexu za různých podmínek. Gelové dráhy 1 až 6 představují (podle pořadí v jakém jsou uvedeny) erythropoietinové izoformy eluované v promývací kapalině s vysokým obsahem solí po promytí sloupce Q-Sepharose rychlým proudem 150mM kyseliny octové o pH 4,7, 150mM kyseliny octové, která není pufrována, 200mM kyseliny octové o pH 4,7, 300mM kyseliny octové o pH 4,7 nebo 300mM kyseliny octové, která není pufrována. Na levé krajní dráze gelu je také obsažen purifikovaný rekombinantní erythropoietin obsahující směs izoform, získaný postupy popsány v příkladu 2

50

55

výše uvedené publikace Lai et al., pouze s tím rozdílem, že místo chromatografie na DEAE-Agarose bylo použito chromatografie na Q-Sepharose.

Obr. 4 ukazuje dělení izoform erythropoietinu 8 až 12, které se provádí tak, že se upravené buněčné médium nanese na sloupec Q-Sepharose a eluuje gradientem s klesající hodnotou pH a stoupající iontovou silou. Alikvoty sudých frakcí od frakce 2 do frakce 40 se podrobí analytické izoelektrické fokusaci. Na levé krajní dráze gelu je také obsažen purifikovaný rekombinantní erythropoietin obsahující směs izoform, získaný postupy pospanými v příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al., pouze s tím rozdílem, že místo chromatografie na DEAE-Agarose bylo použito chromatografie na Q-Sepharose.

Na obr. 5 je znázorněna sekvence aminokyselin humánního erythropoietinu. Čtverečky označují asparaginové zbytky, k nimž jsou připojeny N-vázané uhlohydrátové řetězce a hvězdička označuje serinový zbytek, který je modifikován O-vázaných uhlohydrátovým řetězcem.

Na obr. 6A, 6B a 6C je znázorněna série klonovacích stupňů použitých pro vytvoření plazmidů pro konstrukci a analýzu analogů humánního erythropoietinu. Tyto analogy obsahují aminokyseliny modifikované způsobem znázorněným a obr. 5, který jim dodává přídatná glykosylační místa.

Na obr. 7 je znázorněna analýza Western blot COS buněčných supernatantů erythropoietinu s humánní sekvencí a uvedených analogů erythropoietinu. Analogy [Asn⁹, Ser¹¹]EPO, [Asn⁶⁹]EPO, [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO jsou zkonstruovány způsobem popsáným v příkladu 6. Pro srovnání jsou zde uvedeny též přídatné analogy [Pro¹²⁵, Thr¹²⁷]EPO a [Asn¹²⁶, Ser¹²⁸]EPO, které neobsahují přídatné uhlohydrátové řetězce.

Na obr. 8 je znázorněna analýzy Western blot COS buněčných supernatantů erythropoietinu s humánní sekvencí a charakterizovaných analogů erythropoietinu po zpracování N-glykanázou. Analogy [Thr¹²⁵]EPO a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO jsou zkonstruovány způsobem popsáným v příkladu 6. Pro srovnání jsou zde uvedeny též přídatné analogy [Val¹²⁶]EPO, [Pro¹²⁴]EPO [Pro¹²⁵]EPO, [Thr¹²⁷]EPO, [Pro¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO a [Thr¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO.

Obr. 9 ukazuje izoelektrický fokační gel z fokusace frakcí 2, 3 a 4 získaných chromatografií na Q-Sepharose s obrácenými fázemi (C4) za použití buněčného média podporujícího růst CHO buněk transfekovaných erythropoietinovou cDNA obsahující [Thr¹²⁵]-mutaci. Na levé a pravé krajní dráze gelu je také obsažen purifikovaný rekombinantní erythropoietin obsahující směs izoform, získaný postupy popsány v příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al., pouze s tím rozdílem, že místo chromatografie na DEAE-Agarose bylo použito chromatografie na Q-Sepharose.

Na obr. 10 je znázorněna analýza Western blot COS buněčných supernatantů rekombinantního humánního erythropoietinu (rHuEPO) a zvolených analogů. Konstrukce těchto analogů je popsána v příkladu 6. Analogy N9, N14, N18, N19, N21, N24 a N39 obsahují přinejmenším jeden přídatný uhlohydrátový řetězec, což je dokumentováno nižší pohyblivostí na gelu.

Na obr. 11 je znázorněna analýza Western blot COS buněčných supernatantů rekombinantního humánního erythropoietinu a analogu EPO N14 v průběhu štěpení N-glykanázou. Časové intervaly, v nichž bylo prováděno měření, jsou 0, 4, 12, 45 minut a štěpení přes noc.

Obr. 12 ukazuje izoelektrický fokační gel z fokusace přípravků obsahujících izoformy analogu EPO N14. Směs označená jako nízké izoformy obsahuje analog EPO N14 obsahující převážně 6 až 12 zbytků kyseliny sialové v molekule, směs označená jako střední izoformy obsahuje analog N14 obsahující převážně 10 až 15 zbytků kyseliny sialové v molekule a směs označená

jako vysoké izoformy obsahuje analog N14 obsahující převážně 12 až 17 zbytků kyseliny sialové v molekule.

Obr. 13 ukazuje farmakokinetiku rekombinantního humánního erythropoietinu, izolované izoformy 14 a analogu EPO N14 (izoformy 15 až 17) po intravenosním injekčním podání krysám.

Na obr. 14 je znázorněna zkouška vytěsňování ^{125}I -značeného rekombinantního humánního erythropoietinu z vazby z receptoru erythropoietinu prováděná za chladu za přítomnosti různého množství naznačeného rHuEPO, izolované izoformy 14 nebo analogu EPO N14.

Obr. 15 ukazuje studii myšího hematokritu (poměr plasmy ke krvinkám), při níž se porovnává účinnost vysoké izoformy EPO N14 (0,036 až 0,0712 μg), izolované izoformy 14 (0,036 a 0,0712 μg), nízké izoformy EPO 177 (0,0712 μg) a rHuEPO (0,071 μg).

Následuje podrobný popis tohoto vynálezu.

Předmětem vynálezu jsou izoformy erythropoietinu. Specifické izoformy erythropoietinu získané podle vynálezu a jejich vlastnosti se mohou měnit v závislosti na zdroji výchozího materiálu. Tak například izoformy humánního erythropoietinu izolovaného z moči se liší od izoform rekombinantního erythropoietinu. V přednostním provedení se vynález týká izoformy erythropoietinu se specifickým počtem (tj. s pevným počtem, který je vyšší než 0) zbytků kyseliny sialové v molekule erythropoietinu, přičemž toto číslo je zvoleno ze souboru zahrnujícího čísla 1 až 14. S výhodou je tímto číslem 9, 10, 11, 12, 13 nebo 14. V jiném provedení je toto číslo vyšší než 14 a s výhodou leží v rozmezí od 16 do 23.

Pod označením „izoforma erythropoietinu“, jak se ho používá v tomto popisu, se rozumí erythropoietinový přípravek vykazující jediný izoelektrický bod (pI) a mající stejnou sekvenci aminokyselin. Pod označením „erythropoietin“, jak se ho používá v tomto popisu, se rozumí přírodní erythropoietin, humánní erythropoietin izolovaný z moči, jakož i polypeptidy, které se nevyskytují v přírodě a které mají sekvenci aminokyselin a které jsou glykosylovány způsobem dostatečně kopírujícím přírodní erythropoietin, aby jim to udělilo in vivo biologické vlastnosti spočívající ve stimulaci buněk kostní dřeně pro zvýšenou produkci retikulocytů a červených krvinek.

Zjistilo se, že oddělené izoformy rekombinantního erythropoietinu, které mají sekvenci aminokyselin humánního erythropoietinu izolovaného z moči, odpovídají molekulám erythropoietinu obsahujícím 1 až 14 zbytků kyseliny sialové, přičemž každá z izoform přítomných v purifikovaném rekombinantním erythropoietinu vykazuje účinnost in vivo mající vztah k počtu zbytků kyseliny sialové, které tato izoforma obsahuje.

V přednostním provedení je erythropoietin produktem exprese exogenní sekvence DNA, která byla transfekována do nehumánní eukaryotní hostitelské buňky. V přednostním provedení je tedy erythropoietinem „rekombinantní erythropoietin“. Rekombinantní erythropoietin se s výhodou produkuje postupy popsány v patentu US 4 703 008 (Lin; stejný majitel vlastní i práva k této přihlášce). Rekombinantní erythropoietin se může purifikovat obecnými postupy stejnými v příkladu 2 patentu US 4 667 016 (Lai et al.; stejný majitel vlastní i práva k této přihlášce) nebo alternativně způsobem popsáným v příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al., při němž se však místo chromatografie na DEAE-Agarose použije chromatografie na Q-Sepharose.

Erythropoietin purifikovaný podle příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al. obsahuje podle analýzy IEF převážně 6 izoform. Za použití chromatografických postupů popsáných v příkladu 4 byla kromě toho zjištěna přinejmenším jedna další izoforma s vyšší kyselostí. (Tato kyselější forma migruje na IEF gelu při obsahu zbytků sialové kyseliny nad 14 může obsahovat záporná náboje nepocházející z sialové kyseliny, což dokládá rezistence některých nábojů ke štěpení

sialidázou). Tyto izoformy se od sebe vzájemně liší obsahem kyseliny sialové. Tato skutečnost je v příkladech demonstrována na izolaci 10 takových izoform preparativní IEF a stanovením obsahu kyseliny sialové v 5 z nich. Zjistilo se, že v izoformách zkoušených na obsah kyseliny sialové, je počet zbytků kyseliny sialové 9, 10, 11, 12 nebo 13.

5

Existuje vztah mezi relativní specifickou účinností erythropoietinu in vivo a počtem zbytků kyseliny sialové v molekule erythropoietinu z izoform 5 až 11 (každá izoforma je zde označena počtem zbytků kyseliny sialové v molekule erythropoietinu). Izoformy 11 až 14 vykazují přibližně stejnou relativní specifickou účinnost in vivo. Izoformy 5 až 14 byly zkoušeny na účinnost in vivo pomocí exhypoxického polycythemického biologického stanovení na myších. Množství každé z přítomných izoform se zjistilo Bradfordovým stanovením proteinů, měřením absorpance při 280 nm nebo radioimunoesejem (RIA) pro erythropoietin. Výsledky stanovení RIA vyjádřené v jednotkách/ml se dělí hodnotou 212 770 jednotek/mg erythropoietinového polypeptidu, průměrnou specifickou účinností purifikovaného erythropoietinu stanovenou metodou RIA, a tím se získají hodnoty koncentrace proteinu v izolovaných izoformách nebo směsích izoform, které jsou vyjádřeny v miligramech erythropoietinového polypeptidu na mililitr. Jak je to ukázáno v příkladech, relativní specifická účinnost in vivo stupňovitě stoupá od izoformy 5 k izoformě 11 (viz tabulka 2).

Hodnoty specifické účinnosti in vivo, které jsou v tomto popisu uváděny, představují hodnoty získané měřením relativní specifické účinnosti in vivo a nikoliv měřením absolutní specifické účinnosti in vivo. Hodnot specifické účinnosti se v tomto popisu používá pouze pro srovnávání relativní účinnosti izoform zkoušených pomocí stejného stanovení za stejných podmínek, za použití stejného vnitřního standardu, stejného typu zvířete a za použití stejné analýzy dat použitých pro výpočet specifické účinnosti a za použití stejné zkoušky pro stanovení obsahu proteinu. Žádná z uvedených hodnot specifické účinnosti in vivo u kterékoliv z izoform nepřestavuje inherentní nebo absolutní hodnotu charakteristickou pro tuto izoformu.

Předmětem vynálezu jsou také směsi obsahující dvě nebo více izoform erythropoietinu. Podle jednoho provedení obsahují tyto směsi izoformy obsahující vyšší počet zbytků kyseliny sialové v molekule erythropoietinu, než je předem určený počet, například vyšší počet než 11 nebo 12, například se jedná o směs izoform 12, 13 a 14. Podle jiného provedení obsahují tyto směsi izoformy s předem určeným počtem zbytků kyseliny sialové v molekule erythropoietinu, například s méně než 12, ale více než 8 zbytků kyseliny sialové v molekule, jako je tomu například v případě směsi izoform 9, 10 a 11. Předmětem vynálezu jsou také směsi izoform erythropoietinu, v nichž jsou vzájemná množství izoform stejná nebo různá. Tak například směs izoform 9, 10 a 11 může obsahovat jednotlivé izoformy v různých poměrech, jako například 1 : 1 : 1, 2 : 3 : 1 nebo 20 : 20 : 1.

S výhodou obsahují takové směsi méně než 4 izoformy a jedná se například o směs 11, 12 a 13 nebo o směs izoform 12 a 14 nebo dále o směs izoform 7 a 13.

Takové směsi izoform erythropoietinu se vyrábějí podle vynálezu současnou izolací zvolených izoform erythropoietinu. Tyto postupy zahrnují izolaci jednotlivých izoform takovými technikami, jako je preparativní izoelektrická fokusace nebo výrobu směsí izoform obsahujících předem určený počet zbytků kyseliny sialové (například nad 11) takovými technikami, jako je ionexová chromatografie nebo chromatofokusace. Všechny tyto techniky jsou založeny na dělení proteinů podle náboje.

Ionexová chromatografie a chromatofokusace se obvykle provádí tak, že se buď surový humánní erythropoietin (médium zpracované buňkami), nebo purifikovaný materiál aplikuje na sloupec pryskyřice za podmínek umožňujících vazbu některých nebo všech izoform erythropoietinu k pryskyřici. Pokud se používá surového erythropoietinu, přednostně se protein aplikuje na sloupec při hodnotě pH asi 7, zatímco purifikované proteinové přípravky se mohou aplikovat na sloupec při pH v rozmezí od 7 do asi 4. Po promytí sloupce pufrům o hodnotě pH asi 4 se

izoformy erythropoietinu, které zůstanou navázány na sloupci ionexu, eluují zvýšením pH a koncentrace soli v promývacím pufru nebo aplikací gradientu se snižující se hodnotou pH a zvyšující se iontovou silou při pH asi 4. V případě chromatofokusace se izoformy eluují ze sloupce gradientem se snižující se hodnotou pH nebo promytím sloupce roztokem s vysokou koncentrací soli.

V přednostním provedení se jednotlivé izoformy izolují za použití ionexové chromatografie. Tak například izoforma 14 se izoluje za použití ionexové chromatografie způsobem popsaným v příkladu 8.

Do rozsahu vynálezu spadají také určité analogy humánního erythropoietinu. Pod označením „analog humánního erythropoietinu“, jak se ho používá v tomto popisu, se rozumí erythropoietin zahrnující jednu nebo více změn aminokyselinové sekvence humánního erythropoietinu, která má za následek zvýšení počtu míst připojení kyseliny sialové. Analogy se tvoří místně orientovanou mutagenézí zahrnující adice, delece nebo substituce aminokyselinových zbytků, kterými se zvyšuje nebo mění počet míst, která jsou k dispozici pro glykosylaci. Takové analogy mohou obsahovat větší počet uhlohydrátových řetězců než humánní erythropoietin.

Analogy erythropoietinu podle vynálezu obsahují sekvenci aminokyselin, která zahrnuje přinejmenším jedno přídavné glykosylační místo. Analogy obsahující vyšší koncentraci kyseliny sialové než její obsah v humánním erythropoietinu se získávají zavedením glykosylačních míst, které nezpůsobí zmatení sekundární nebo terciární konformace potřebné pro biologickou účinnost. Analog humánního erythropoietinu s výhodou obsahuje 1, 2 nebo 3 přídavná místa pro N-glykosylaci nebo O-glykosylaci, což se projeví zavedením 1, 2 nebo 3 přídavných N-vázaných nebo O-vázaných uhlohydrátových řetězců. Tak například leucin v poloze 69 se nahradí asparaginem, za vzniku sekvence Asn-Leu-Ser, která slouží jako čtvrté místo pro N-glykosylaci. Taková změna může obvykle dodat až čtyři přídavné zbytky kyseliny sialové do molekuly. Jako příklady změn, kterými lze vytvořit přídavná O-glykosylační místa, je výměna alaninu v poloze 125 za threonin a alaninů v polohách 124 a 125 za prolin (v poloze 124) a threonin (v poloze 125). Je možno sestavit analogy obsahující jeden nebo více přídavných N-vázaných a O-vázaných řetězců, jako jsou například analogy NO1 a NO2 popsané v tabulce 5. Odborníkům v tomto oboru je zřejmé, že do rozsahu tohoto vynálezu spadá i mnoho dalších analogů humánního erythropoietinu obsahujících přídavná místa pro glykosylaci.

Analogy se zvýšenou četností připojení uhlohydrátů v glykosylačních místech rovněž spadají do rozsahu tohoto vynálezu. Tyto analogy obvykle zahrnují substituci jedné nebo více aminokyselin v těsném sousedství k N-vazebnému nebo O-vazebnému místu. Díky těmto změnám aminokyselin bude větší část erythropoietinových polypeptidů obsahovat uhlohydrátovou modifikaci. Glykosylační místa mohou být přirozená nebo mohou být vytvořena mutací. Tak například analog N13 neobsahuje přídavný uhlohydrátový řetězec, přestože do něj bylo zavedeno v poloze 88 glykosylační místo. Analogy N14 a N80, které obsahují v poloze 87 výměnu za serin (N14) nebo za valin (N18), obsahují v poloze 88 přídavný uhlohydrátový řetězec.

Do rozsahu vynálezu spadají také analogy obsahující jednu nebo více aminokyselin, kterými je nastaven karboxylový konec erythropoietinu, přičemž toto nastavení karboxylového konce zajišťuje zavedení alespoň jednoho přídavného uhlohydrátového místa. Při jednom provedení se zkonstruuje analog fúzí 28 karboxy-terminálních aminokyselin humánního chorionického gonadotropinu (HCG) k argininovému zbytku v poloze 166 humánního erythropoietinu. HCG karboxyterminální fragment obsahuje čtyři místa pro O-glykosylaci (Kessler et al., J. Biol. Chem. 254, 7907 (1979)).

V tabulkách 3, 4 a 5 jsou uvedeny analogy erythropoietinu obsahující přídavná místa pro N-vázané a/nebo O-vázané uhlohydrátové řetězce. Tyto analogy obsahují sekvenci Asn-X-Ser/Thr zavedenou substitucí do různých poloh řetězce humánního erythropoietinového

polypeptidu, za vzniku N-vazebných míst nebo obsahují zavedené zbytky serinu nebo threoninu, za účelem vytvoření O-vazebných míst.

V tabulce 6 jsou uvedeny analogy, umožňujícím zavedení přinejmenším jednoho přidavného N-vázaného nebo jednoho přidavného O-vázaného uhlohydrátového řetězce nebo zavedení přidavného N-vázaného a O-vázaného řetězce současně, jak je to dokumentováno migrací těchto glykoproteinů na SDS gelech (příklad 7). Jak je zřejmé z tabulek 3 a 6, analogy obsahující jedno nebo více přidavných míst pro připojení uhlohydrátu nemusí nutně vést ke vzniku molekul erythropoietinu obsahujících přidavné uhlohydrátové řetězce. Tak například zavedení threoninové substance do polohy 123 a 125 má za následek připojení O-vázaného uhlohydrátového řetězce, zatímco zavedení serinové nebo threoninové substituce do jiných poloh nevede k získání analogů s přidavnými O-vázanými řetězci (viz tabulka 4). Zavedení asparaginových substitucí do poloh 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 a 138 do sekvence humánního erythropoietinu se však projeví zavedením N-vázaného řetězce v těchto polohách. Fúze HCG polypeptidového fragmentu s argininovým zbytkem v poloze 16 humánního erythropoietinu vede ke vzniku fúzané molekuly erythropoietin-HCG obsahující přinejmenším dva přidavné O-vázané uhlohydrátové řetězce.

Analogy erythropoietinu podle vynálezu zahrnují též erythropoietin, jehož sekvence aminokyselin obsahuje přesmyk alespoň jednoho glykosylačního místa. Pod označením „přesmyk glykosylačního místa“, jak se ho používá v tomto popisu, se rozumí delece jednoho nebo více glykosylačních míst v humánním erythropoietinu a zavedení jednoho nebo více nepřirozených glykosylačních míst. Jako příklady takových přesmyků je možno uvést analogy R1, R2 a R3, které byly sestaveny delecí N-vazebných míst v polohách 23 (R1), 38 (R2) nebo 83 (R3) a zavedením N-vazebného místa do polohy 88. Jsou však možné i další četné typy přesmyků uhlohydrátových míst a vzniklé analogy mohou nebo nemusí být vyšší počet glykosylačních míst ve srovnání s humánním erythropoietinem.

Analogy R1, R2 a R3 byly analyzovány na biologickou účinnost in vivo a zjištěné výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Zavedení N-vázaného řetězce v poloze Asn88 vrátí biologickou účinnost erythropoietinu, z něhož bylo delecí vypuštěno kterékoli ze tří přirozených N-vazebných míst. Tyto výsledky ukazují, že polohy uhlohydrátových řetězců v erythropoietinu se mohou měnit za účelem získání užitečných analogů, aniž by se podstatně ovlivnila jejich biologická účinnost.

Do rozsahu tohoto vynálezu spadají také sekvence DNA kódující analogy erythropoietinu obsahující přidavná místa pro N-vázané a/nebo O-vázané řetězce, analogy obsahující přesmyk alespoň jednoho místa připojení pro uhlohydrátový řetězec a analogy obsahující jedno nebo více aminokyselin prodlužujících karboxylový konec erythropoietinu. Postupy, kterých se používá pro zavádění změn do sekvence DNA kódující humánní erythropoietin za účelem vytvoření nebo změnu vazebných míst pro uhlohydrátové řetězce jsou uvedeny v příkladu 6.

Tyto analogy erythropoietinu mohou být produktem exprese exogenní sekvence DNA, tj. sekvence DNA vytvořené technologií rekombinantní DNA nebo se může jednat o syntetické produkty. Exogenní sekvence DNA zahrnuje cDNA, genomovou DNA nebo chemicky syntetizovanou DNA kódující analog erythropoietinu.

Do rozsahu vynálezu spadají také rekombinantní DNA plazmidy a eukaryontní hostitelské buňky, které jsou užitečné pro expresi takových analogů. Expresní vektory zahrnují jakékoliv vektory, které jsou schopny exprimovat klonované sekvence DNA v eukaryontní hostitelské buňce, zejména vektory používané pro expresi v buňkách COS a CHO. Jako příklady takových vektorů je možno uvést plazmidy pEC a pDECdelta popsané v příkladu 6 dále. Kultivace hostitelských buněk COS a CHO exprimujících analogy erythropoietinu se provádí za použití postupů, které jsou odborníkům v tomto oboru známy.

Izolované izoformy a směsi izoform odvozené od analogů erythropoietinu se získají výše popsanými metodami pro výrobu izoform humánního erythropoietinu. Tyto metody mohou zahrnovat izoelektrickou fokusaci, ionexovou chromatografii a chromatofokusaci. Pro výrobu jednotlivých izoform a směsí izoform analogů erythropoietinu se přednostně používá ionexové chromatografie.

Zvýšením počtu uhlohydrátových řetězců v erythropoietinu, a tedy zvýšením počtu zbytků kyseliny sialové, vztaženého na molekulu erythropoietinu, se mohou výsledným produktům dodat výhodné vlastnosti, jako je zvýšená rozpustnost, vyšší odolnost vůči proteolýze, snížená imunogenicita, zvýšený poločas životnosti v séru a zvýšená biologická účinnost.

Média zpracovaná buňkami CHO exprimujícími analogy erythropoietinu byl analyzována na biologickou účinnost in vivo a zjištěné výsledky jsou uvedeny v tabulce 6. Několik z těchto zkoušených analogů vykazuje účinnost, která je třikrát nebo vícekrát vyšší než účinnost humánního erythropoietinu. Zejména analogy obsahující přídavný N-vázaný uhlohydrátový řetězec v některé z poloh 30 nebo 88 vykazují dvojnásobně až trojnásobně vyšší účinnost než humánní erythropoietin, zatímco analogy obsahující přídavné O-vázané řetězce díky fúzi humánního erythropoietinu s fragmentem HCG polypeptidu vykazují přinejmenším dvakrát vyšší účinnost.

Dva analogy erythropoietinu obsahující přídavné uhlohydrátové řetězce byly purifikovány a byly izolovány směsí s různým obsahem kyseliny sialové (příklad 8). Analogy Thr¹²⁵ a Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ (EPO N14) byly rozděleny do tří separátních frakcí izoform a byla stanovena biologická účinnost každé z těchto frakcí. Výsledky, které jsou uvedeny v tabulce 8 ukazují, že izoformové frakce EPO N1 s vyšším obsahem kyseliny sialové vykazují vyšší účinnost in vivo.

Frakce izoform s vyšším obsahem kyseliny sialové z analogu EPO N14 a rekombinantní humánní erythropoietin (izoformy 9 až 14) byly studovány za použití zkoušky vazby k receptoru, farmakokinetických pokusů a pokusů zaměřených na stanovení zvýšení hematokritu u myši. Výsledky těchto zkoušek ukazují, že existuje přímý vztah mezi obsahem kyseliny sialové, poločasem životnosti a schopností zvýšit hematokrit ošetřených myši. Jak je zřejmé z obr. 13, 14, a 15, frakce izoform s vysokým obsahem kyseliny sialové z EPO N14 vykazují podstatně vyšší poločas in vivo a vyvolává vyšší nárůst hematokritu než izolovaná izoforma 14 nebo rekombinantní humánní erythropoietin, přestože se frakce izoform s vysokým obsahem kyseliny sialové z EPO N14 neváže k receptoru tak silně.

Předmětem vynálezu jsou také savčí hostitelské buňky [například buňky z ovarií čínského křečka (CHO)], které přednostně syntetizují izoformy humánního erythropoietinu nebo analogů erythropoietinu obsahující vyšší počet zbytků kyseliny sialové v molekule, než je počet specifický, například nad 10 zbytků kyseliny sialové v molekule. Molekuly erythropoietinu obsahují N-vázané a O-vázané a O-vázané oligosacharidové struktury, které mohou omezovat obsah kyseliny sialové v molekule. Tak například tetraantenární (se čtyřmi rozvětveními) N-vázané oligosacharidy nejčastěji poskytují čtyři možná místa pro připojení kyseliny sialové, zatímco biantenární a triantenární oligosacharidové řetězce, kterými může být nahrazena tetraantenární forma na asparaginových vazebných místech, obvykle obsahuje nejvýše pouze 2 nebo 3 připojené zbytky kyseliny sialové. O-vázané oligosacharidy obvykle poskytují dvě místa pro připojení kyseliny sialové. Molekuly erythropoietinu tedy mohou přijmout celkem 14 zbytků kyseliny sialové, za předpokladu, že jsou všechny tři N-vázané oligosacharidy tetraantenární. Kultury savčích buněk se podrobí screeningu a buňky, které přednostně zavádějí tetraantenární řetězce do rekombinantního erythropoietinu, což má za následek maximalizaci počtu míst pro připojení zbytků kyseliny sialové.

N-vázané oligosacharidy erythropoietinu izolovaného z moči obsahují kyselinu sialovou jak s vazbou α 2,3, tak s vazbou α 2,6 ke galaktóze (Takeuchi et al., J. Biol. Chem. 263, 3 657 (1988)). Kyselina sialová s vazbou α 2,3 se obvykle aduje na galaktózu na mannosové větvi α

1,6 a kyselina sialová s vazbou α 2,6 se aduje na galaktózu na mannosové větvi α 1,3. Pro zavádění kyseliny sialové do mannosové α 1,6 a mannosové α 1,3 větve jsou nejúčinnější enzymy schopné vyvolávat adici sialové kyseliny (β -galaktosid α 2,3 sialyltransferáza a β -galaktosid α 2,6 sialyltransferáza).

- 5 Pro produkci rekombinantních glykoproteinů, včetně rekombinantního erythropoietinu, se jako hostitelských buněk obvykle používá buněk z ovarii čínského křečka (CHO), které jsou deficientní na dihydrofolát reduktázu (DHFR). Tyto buňky neexprimují enzym β -galaktosid α 2,6 k N-vázaným oligosacharidům glykoproteinů produkovaných v těchto buňkách (Mulsters et al., Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986); Takeuchi et al., J. Chromatogr. 400, 207 (1987)).
- 10 V důsledku toho rekombinantní erythropoietin produkovaný v buňkách CHO neobsahuje kyselinu sialovou s vazbou 2,6 ke galaktóze (Sasaki et al. (1987), výše uvedená citace; Takeuchi et al. (198) výše uvedená citace)).
- 15 V dalším provedení tohoto vynálezu je humánní erythropoietin nebo analog erythropoietinu produkuje v buňkách CHO, které jsou transfekovány funkčním genem β -galaktosid α 2,6 sialyltransferázy, za účelem zavedení kyseliny sialové do galaktózy s vazbou α 2,6. Výsledné izoformy budou obsahovat kyselinu sialovou vázanou ke galaktóze jak vazbou α 2,3, tak vazbou α 2,6. Popis technik, kterými se vytvářejí modifikované buňky CHO nebo jiné hostitelské savčí
- 20 buňky je uveden v Lee et al., J. Biol. Chem. 264, 13 848 (1989).

- Do rozsahu tohoto vynálezu spadají také farmaceutické prostředky obsahující terapeuticky účinné množství specifické izoformy nebo směsi izoform v kombinaci s vhodným ředidlem, pomocnou látkou a/nebo nosičem užitečným při léčbě erythropoietinem. Do rozsahu vynálezu spadají též
- 25 farmaceutické prostředky obsahující terapeuticky účinné množství analogu erythropoietinu spolu s vhodným ředidlem, pomocnou látkou a/nebo nosičem. Pod označením „terapeuticky účinné množství, jak se ho používá v tomto popisu, se rozumí množství, s nímž se za daných podmínek a při daném režimu podávání dosáhne terapeutického účinku. Isoformy humánního erythropoietinu nebo analogy erythropoietinu se přednostně podávají parenterální cestou. Konkrétní
- 30 cesta podávání bude záviset na léčené chorobě. Isoforma humánního erythropoietinu nebo analogy erythropoietinu se přednostně podávají ve formě prostředku obsahujícího vhodný nosič, jako je humánní sérový albumin, vhodné ředidlo, jako je pufovaný roztok chlorid sodného a/nebo vhodný adjuvans. Za požadovanou dávku bude požadována dávka postačující pro zvýšení hematokritu léčených pacientů. Tato dávka se bude měnit v závislosti na závažnosti léčené
- 35 choroby, použitím způsobu podávání apod.

- Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter, a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují. Jako erythropoietinového
- 40 standardu se při biologických zkouškách in vivo popsanych v příkladech používá rekombinantního erythropoietinového standardu standardizovaného proti částečně purifikovanému erythropoietinovému standardu z moči. Měří se tedy pouze relativní specifická účinnost in vivo. Specifická účinnost in vivo je proto také vyjadřována v „jednotkách/ml“, „jednotkách/mg“ a jednotkách/ A_{280} a nikoliv v jednotkách „IU/ml“, „IU/mg“ a „IU/ A_{280} “, poněvadž použitý erythropoietinový standard nebyl přímo korelován s žádným existujícím mezinárodním
- 45 standardem.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

5

Izolace izoform rekombinantního erythropoietinu

Rekombinantní erythropoietin se vyrobí způsobem popsaným v publikaci Lin, uvedené výše. Rekombinantní erythropoietin použitý jako výchozí látka pro první a třetí izolaci izoformy se purifikuje způsobem popsaným v příkladu 2 publikace Lai et al., uvedené výše. Výchozí látka pro druhou a pátou izolaci izoformy se purifikuje způsobem popsaným ve výše uvedené publikaci Lai et al., který je modifikován tím, že se použije chromatografie na Q-Sepharose. Tyto přípravky obsahují směsi izoform rekombinantního erythropoietinu se stejnou aminokyselinovou sekvencí, jako má humánní erythropoietin získaný z moči a převážně obsahují izoformy 9 až 14. Výchozí materiál pro čtvrtý preparativní postup pro získání izoformy představuje materiál eluovaný během promývání sloupce anexu z příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al. 5mM kyselinou octovou/1mM glycinem/6M močovinou. Tato frakce obsahuje izoformy s počtem zbytků sialové kyseliny 9 nebo nižším a dále se před použitím na preparativní izoelektrickou fokusaci purifikuje gelovou filtrační chromatografií popsanou v příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al. Při šesté přípravě izoformy se jako výchozího materiálu používá purifikovaného rekombinantního erythropoietinu s obsahem 4 až 13 zbytků kyseliny sialové. Tento materiál se purifikuje způsobem popsaným v příkladu 2 publikace Lai et al., uvedené výše, pouze s tím rozdílem, že se modifikuje zpracování ionexového sloupce (eluce rekombinantního erythropoietinu se provádí gradientem chloridu sodného při pH 8,4 a vypustí se promývání kyselinou octovou/močovinou. Při tom se dosáhne retence většiny izoform obsažených ve výchozím materiálu.

Při šesti různých preparativních postupech pro získání jednotlivých izoform se použije preparativní izoelektrické fokusace v granulovaném gelovém loži (Ultradex LKB). Tyto postupy se provádějí v podstatě stejně jako je to uvedeno v poznámce LKB Application Note 198. Používá se alfolytů Pharmalyte 2.5–5 (Pharmacia a použití gelové lože obsahuje 5M močovinu.

Při první přípravě se přibližně 20 mg rekombinantního erythropoietinu v 6,8 ml 20mM citranu sodném/100mM chloridu sodném o pH 7,0 nanese na gel a přibližně 16 hodin fokusuje při výkonu 8 W. Po izoelektrické fokusaci se pásy izoform na gelu vizualizují přetisknutím gelového lože na papír. Získaný otisk se fixuje máčením v fixačním roztoku (40% methanol/10% kyselina octová/10% TCA/3,5% kyselina sulfosalicylová) při celkem třech výměnách fixační lázně, přičemž zpracování v každé lázni se provádí 10 minut při teplotě místnosti, potom se provede jedna výměna za roztok o složení 40% methanol/10% kyselina octová (zpracování se provádí při teplotě 30 až 60 °C po dobu přibližně 10 minut), pásy se 15 minut barví při 60 °C 0,125% roztokem modří Coomessie Blue R-250/4% methanol/10% kyselina octová, načež se provede odbarvení v 7,5% methanolu/10% kyselině octové, aby se zviditelnily oddělené izoformy. Oblast granulovaného gelového lože obsahující izoformy (asi 50 % pryskyřice) se odstraní, smíchá s vodou (asi 16 ml) a suspenze se nalije na misku o rozměrech 14 x 62 cm a odpaří se na čistou hmotnost přibližně 40 g. Vzniklý přípravek se fokusuje podruhé a výše uvedeným způsobem se provede kontaktní otisk gelového lože. Část gelu obsahující každou ze 6 rozeznatelných izoform se z gelového lože odstraní.

Eluce izoform z gelu se provede přidavkem roztoku obsahující 10mM Tris-HCl o pH 7,0/5mM Chaps ke každé izoformě. Každá vzniklá suspenze se uvede do krátké kolony a eluuje pufrem Tris-Chaps. Eluáty se shromáždí a odděleně aplikují na krátké kolony (konfigurace s otevřenou kolonou) obsahující pryskyřici s obrácenou fází Vydac C4 ekvilibrovanou ve 20% ethanolu/10mM Tris-HCl o pH 7,0. Sloupce se postupně vyvíjejí 20% ethanol/10mM Tris-HCl o pH 7,0, 35% ethanol/10mM Tris-HCl o pH 7,0 a 65% ethanol/10mM Tris-HCl o pH 7,0. Frakce eluovaná 65% ethanol/10mM Tris se zředí v poměru 1:1 10mM Tris-HCl

o pH 7,0, zkoncentruje a potom se provede výměna pufru (10mM Tris-HCl o pH 7,0) v mikrokonzentrátoru Centricon-10 (Amicon). Analytická izoelektrická fokusace tohoto přípravku se provádí v podstatě způsobem popsaným v poznámce LKB Technical Note 250 za použití Servalyte 3-5 amfolinů (Serva) na polyakrylamidovém gelu obsahujícím 5m močovinu.

5

Při druhém preparativním postupu se přibližně 25 mg rekombinantního erythropoietinu v 6,5 ml deionizované vody nanese na gel a fokusuje při 2,5 W po dobu 35 minut a při 10 W po dobu asi 17 hodin. Pásky fokusovaného proteinu, které jsou viditelné v gelovém loži se odstraní, a tak se získá celkem 11 produktů. Objem každého z těchto produktů se upraví na 7,5 ml deionizovanou vodou a 20 ml každého z výsledných supernatantů se podrobí analytické izoelektrické fokusaci popsané výše. Ke každému z produktů se přidá 5 ml 1,5M Tris-HCl o pH 8,8 a každá ze suspenzí se převede do malé kolony a sloupcem se nechá protéci kapalná fáze. Průtoky se promyje přibližně 3 objemy sloupce 0,5M Tris-HCl o pH 7 a promývací roztok se spojí s eluátem. Spojené eluáty se zkoncentrují a provede se výměna pufru za 20mM citran sodný/100mM chlorid sodný o pH 7,0 za použití ultrafiltračního zařízení pro jedno použití (Amicon) s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10 000 dalton. Zkoncentrované roztoky (přibližně 0,5 ml) se potom nechají projít filtrem z acetátu celulózy s vylučovací mezí 0,22 μ m. Pomocí analytické izoelektrické fokusace se zjistí, že 5 produktů obsahuje převážně vždy jedinou izoformu 10, 11, 12, 13 a 14.

20

Při třetím preparativním postupu se přibližně 30 mg rekombinantního erythropoietinu ve 21,8 ml destilované vody nanese na gel a provede se fokusace 25 minut při 2 W, 20 hodin při 10 W a 15 minut při 15 W. Pásky proteinu odpovídající jednotlivým izoformám se zjistí vizuálně a odstraní z gelového lože. K izoformám izolovaným na gelu se přidá destilovaná voda, čímž vznikne suspenze a výsledné supernatanty se analyzují analytickou izoelektrickou fokusací. Ke každé suspenzi se přidá stejný objem 1M Tris-HCl o pH 7,2, suspenze se převedou do separátních krátkých kolon a kapalná fáze se nechá protéci kolonou, aby se eluovaly izoformy. Každý eluát se zkoncentruje, provede se výměna pufru za 20mM citran sodný/100mM chlorid sodný o pH 7,0 za použití ultrafiltračního zařízení pro jedno použití (Amicon) s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10 000 dalton. Pomocí analytické izoelektrické fokusace se zjistí, že byly získány produkty obsahující převážně jednotlivé izoformy 9, 10, 11, 12, 13 a 14.

Při čtvrtém preparativním postupu pro získání izoform se jako výchozího materiálu použije erythropoietinu obsahujícího izoformy 3 až 9 (vyrobeného výše popsaným způsobem). Před preparativní izoelektrickou fokusací, která se provádí v podstatě způsobem popsaným v souvislosti s preparativními postupy 1 až 3, se amfolyty (Pharmalyte 2,5-5) prefrakcionují v izoelektrické fokusační cele s kapalnou fází Rotofor (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA), aby se získalo amfolytové rozmezí vhodnější pro nižší izoelektrické body výchozího materiálu. Prekrakcionace se provádí tak, že se 6,7 ml Pharmalyte 2,5-5 smíchá s 15 g močoviny a objem směsi se purifikovanou vodou doplní na 50 ml. Vzniklá směs se frakcionuje v zařízení Rotofor při 10 W, teplotě 1 °C po dobu 5,5 hodiny za použití 0,1M kyseliny fosforečné, jako anolytu a 0,1M hydroxidu sodného jako katolytu. Amfolytové frakce s naměřenými hodnotami v rozmezí od 4,5 do asi 6 se použijí na izoelektrickou fokusaci v plochem loži.

Amfolyty se odstraní z izoform za použití zařízení CentriLuter (Amicon, Danvers, Massachusetts, USA) a za použití zařízení Centricon s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10 000 dalton (Amicon). Přitom se pracuje za těchto podmínek: 0,18 Tris-pufr o pH 8,8, 100 V, 25 až 30 mA, 3 hodiny. U izoform se provede výměnu pufru (0,1M chlorid sodný) pomocí gelové filtrace za použití náplně Sephadex G-25 (Pharmacia). Analytická izoelektrická fokusace 5 výsledných produktů ukazuje, že tyto produkty obsahují izoformy 4, 5, 6, 7 a 8. Isoforma 4 přechází ve formě několika pásů, což ukazuje, že u ní mohla proběhnout v určitém rozsahu degradace.

Pátý preparativní postup pro získání izoform se modifikuje zařazením prefokusačního stupně do izoelektrického fokusačního postupu na plochem loži. Při této modifikaci se protein nepřidá ke

směsi amfolytu, močoviny a gelu před elektroforézou, ale zavede se do izoelektrického fokusačního zařízení po vytvoření gradientu pH v gelovém loži. Po provedení prefokuse (75 ml, 1 500 Volt–hodin) se úsek gelového lože v rozmezí od 2,25 do 4,25 cm od katody vyjme, smíchá s roztokem erythropoietinu a vrátí zpět do gelového lože. Po izoelektrické fokusaci se z gelového lože izolují izoformy 10, 11, 12, 13 a 14 a oddělí se od amfolytů ultrafiltrací za použití zařízení Centricon–10 (Amicon).

Modifikace prefokusací se provádí z toho důvodu, aby se charakteristiky ultrafialové absorbance izoformových přípravků připodobnily charakteristikám výchozího rekombinantního erythropoietinu. Toto zlepšení spektrální charakteristik je zřejmé z poměru absorbance izolovaných izoformem při 280 a 260 nm. Průměrný poměr absorbance při 280 nm k absorbanci při 260 nm (A_{280}/A_{260}) u izoformem z preparativních postupů 2 a 3 (bez prefokusace) je $1,36 \pm 0,11$, zatímco průměrný poměr A_{280}/A_{260} u preparativních postupů 5 a 6 (s prefokusací) je $1,68 \pm 0,20$. Když se z výpočtu vyloučí izoforma č. 14, dosáhne se průměrného poměru A_{280}/A_{260} v případě preparativních postupů 5 a 6 hodnoty $1,74 \pm 0,09$ (izoforma 14 má možná nejvíce atypické spektrum, poněvadž je přítomna v nejmenším množství a je tedy náchylnější k interferencím stopovými nečistotami složek amfolytu nebo z toho důvodu, že je nejbližší elektrodě v průběhu izoelektrické fokusace na plochem loži. Průměrná hodnota poměru A_{280}/A_{260} pro rekombinantní erythropoietin vyrobený podle příkladu 2 výše uvedené publikace Lai et al. (za použití modifikace popsané výše, která spočívá v tom, že se jako anoxové pryskyřice použije 0–Sepharose) je $1,91 \pm 0,04$.

Jak již bylo uvedeno výše, výchozím materiálem pro šestý preparativní postup pro výrobu izoformem je rekombinantní erythropoietinový přípravek obsahující izoformy 4 až 13. Amfolyty se prefokusují v zařízení Rotofor tak, jako v případě čtvrtého přípravku. Frakce amfolytu s naměřenými hodnotami pH v rozmezí 3,7 až 4,8 se podrobí izoelektrické fokusaci na plochem loži. Ploché lože se prefokusuje tak, jako v případě pátého preparativního postupu a po ultrafiltraci (Centricon 10) pro odstranění nosičových amfolytů se získají izoformy č. 9, 10, 11, 12 a 13.

Příklad 2

Obsah kyseliny sialové v izoformách rekombinantního erythropoietinu

U izoformem izolovaných způsobem popsaným v příkladu 1 a erythropoietinu purifikovaného způsoby popsanými ve výše uvedené publikaci Lai et al. (směs izoformem 9 a 14) se provede výměna pufru za použití 0,10 až 0,15M chloridu sodného a provede se analýza na obsah kyseliny sialové za použití modifikovaného postupu popsaného v Jourdian et al., J. Biol. Chem. 246, 430 (1971). Zbytky kyseliny sialové se odštěpí od glykoproteinů hydrolýzou pomocí 0,35M kyseliny sírové (80 °C, 30 minut) a vzniklé roztoky se neutralizují před analýzou hydroxidem sodným. Za účelem odhadu množství přítomného erythropoietinového proteinu se provede Bradfordovo stanovení proteinů (Bradford, Anal. Biochem. 72, 248 (1976) za použití rekombinantního erythropoietinu s aminokyselinovou sekvencí humánního erythropoietinu, jako standardu. Použije se zkouškových činidel a mikrometody Bio–Rad. Výsledky vyjádřené v mol kyseliny sialové na mol erythropoietinu jsou zřejmé z tabulky 1. Isoformy se označí podle počtu zbytků sialové kyseliny v molekule a vykazují rozmezí od nejméně kyselých (izoforma 9) do nejkyselějších (izoforma 13).

Izoformy 9 až 13 jsou přítomny v gelových drahách 6 až 10 (viz obr. 1). Množství izoformy 14 není dostatečné pro přesné změření obsahu kyseliny sialové. Obsah kyseliny sialové v této izoformě se dedukuje na základě migrace této izoformy na IEF gelech vzhledem k ostatním izoformám. Obsah kyseliny sialové v izoformách 5 až 8 (přípravek č. 4) nebyl měřen, ale podobně se dedukuje na základě migrace na IEF gelech.

Tabulka 1

Izoforma erythropoietinu	Obsah kyseliny sialové [mol/mol erythropoietinu]
izoforma 13	$12,9 \pm 0,5$
izoforma 12	$11,8 \pm 0,2$
izoforma 11	$11,0 \pm 0,2$
izoforma 10	$9,8 \pm 0,3$
izoforma 9	$8,9 \pm 0,6$
směs izoformem (9 až 14)	$11,3 \pm 0,2$

Příklad 3

5 Účinnost izoformem rekombinantního erythropoietinu

Izoformy izolované způsobem popsaným v příkladu 1 se zkoušejí postupem využívajícím absorbanci při 280 nm, Bradfordovým stanovením proteinů a metodou RIA pro erythropoietin, aby se zjistilo množství přítomného rekombinantního erythropoietinu. Pro stanovení relativní biologické účinnosti in vivo se použije exhypoxického polycytohemického biostanovení na myších (Cotes et al., Nature, 191, 1065 (1961)). Při kvantitativním stanovení množství přítomného erythropoietinového proteinu za použití radioimunoeseje pro erythropoietin se u některých izoformem naměří vyšší relativní specifické účinnosti in vivo v důsledku zjevně snížené imunoreaktivity imunoformem obsahujících velké množství kyseliny sialové, což vede k podhodnocení koncentrace erythropoietinu, a tedy nadhodnocení relativní specifické účinnosti in vivo u většiny negativních izoformem. Výsledky biostanovení na myších, vyjádřené v jednotkách/ml, se dělí odpovídajícími koncentracemi proteinu, přičemž se získají specifické účinnosti in vivo vyjádřené v jednotkách/mg erythropoietinového polypeptidu. Hodnoty specifické účinnosti jsou uvedeny v tabulce 2.

V tabulce 2 znamená index „n“ počet nezávislých izoformových přípravků jejichž výsledky přispívají k výsledné hodnotě specifické účinnosti. Ve většině případů bylo s každým izoformovým přípravkem provedeno několik stanovení in vivo. Stejná data in vivo přispívají k výpočtům specifické účinnosti ve všech tří sloupcích. Obsah erythropoietinového polypeptidu v jednotkách/mg se stanoví na základě absorbance při 280 nm, na základě potence při radioimunoeseji nebo z výsledků Bradfordova stanovení proteinu. Jako standardu pro Bradfordovo stanovení proteinů se používá purifikovaného rekombinantního erythropoietinu obsahujícího izoformy 9 až 14. Hodnota indexu „n“ může být u výpočtů pořízených za použití dat z Bradfordova stanovení proteinů nižší, poněvadž některé přípravky již v době provádění Bradfordova stanovení nebyly k dispozici.

Jako standardu pro radioimunoeseje a pro stanovení in vivo se používá erythropoietinu purifikovaného způsobem popsanými v Lai et al. (výše uvedená publikace), který obsahuje směs izoformem 9 až 14.

Hodnoty relativní specifické účinnosti, které jsou vyjádřeny v jednotkách/mg (U/mg) erythropoietinového polypeptidu, je možno převést na jednotky/ A_{280} vynásobením hodnotou $0,807 \text{ mg erythropoietinového polypeptidu}/A_{280}$. Tento převodní faktor se získá vynásobením extinkčního koeficientu pro erythropoietin ($1,345 \text{ mg}/A_{280}$) obsahem proteinu v erythropoietinovém glykoproteinu (přibližně 60 % hmotnostních, Davis et al., Biochemistry, 26, 2633 (1987)) a tím se získá hodnota v mg erythropoietinového polypeptidu/ A_{280} (tj. $1,345 \text{ mg erythropoietinu}/A_{280} \times 0,60 \text{ mg polypeptidu/mg erythropoietinu} = 0,807 \text{ mg polypeptidu}/A_{280}$). Kromě toho je možno hodnoty specifické účinnosti vyjádřené v jednotkách/mg erythropoietinového polypeptidu vynásobit faktorem $0,60 \text{ mg polypeptidu/mg erythropoietinového glykoproteinu}$, a tím se získají hodnoty specifické účinnosti vyjádřené v jednotkách/mg erythropoietinového glykoproteinu.

T a b u l k a 2

Isoforma	Polyeptid (U/mg) Bradfordovo		Polyeptid (U/mg)		Polyeptid (U/mg)	
	stanovení proteinu	n	(na základě A ₂₈₀)	n	(na základě RIA)	n
14	289 400 ± 3 100	2	205 800 ± 37 700	2	366 700 ± 55 900	2
13	307 600 ± 30 600	4	258 700 ± 59 500	5	337 200 ± 40 200	5
12	275 200 ± 55 600	4	258 400 ± 41 700	5	287 700 ± 42 600	5
11	282 700 ± 41 100	3	255 800 ± 67 300	4	251 400 ± 62 700	4
10	188 000 ± 1 900	1	170 300 ± 34 500	3	171 900 ± 31 600	3
9	-		96 600 ± 46 700	2	113 600 ± 39 600	2
8	65 200 ± 3 800	1	70 600 ± 4 100	1	61 000 ± 3 500	1
7	46 200 ± 5 800	1	50 300 ± 6 300	1	42 800 ± 5 400	1
5	16 600 ± 1 700	1	18 300 ± 1 900	1	15 500 ± 1 600	1

Data uvedená v tabulce 2 jsou také zpracována graficky na obr. 2A, 2B a 2C. Tato data ukazují, že relativní účinnost erythropoietinu in vivo stoupá v závislosti na obsahu kyseliny sialové až do izoformy č. 11. Isoformy 11 až 14 vykazují v podstatě stejnou relativní biologickou účinnost in vivo (to je nejzjevnější, když se koncentrace izoformy 14 vyjádří za použití hodnoty z Bradfordova stanovení. Bradfordova hodnota může být pro izoformu 14 přesnější s ohledem na obecně nízkou dosaženou koncentraci a v důsledku toho na obtížnost stanovení A_{280} a nejzjevněji sníženou reaktivitu při RIA u velmi negativních forem, viz výše uvedená diskuse.) Vyšší relativní specifická účinnost in vivo izoforem erythropoietinu s větším množstvím sialové kyseliny je nejpravděpodobněji způsobena delším poločasem životnosti těchto forem v oběhu. Isoformy 9 a 13 byly označeny radioaktivním jodem (^{125}I) a byla změřena jejich rychlost clearance u krysy. Poločas životnosti v oběhu je v případě izoformy 13 podstatně delší než v případě izoformy 9.

Příklad 4

Selekce směsí izoforem rekombinantního erythropoietinu chromatografií na Q-Sepharose

Média zpracovaná buňkami produkujícími rekombinantní erythropoietin (získaná postupy popsanými ve výše uvedené publikaci Lin) se zkoncentrují a diafiltrují proti 10mM Tris o pH 7,2. Koncentrace proteinu se stanoví Bradfordovým proteinovým mikrostanovením za použití hovězího sérového albuminu jako standardu. K 19,6 ml roztoku obsahujícímu 40 mg celkového proteinu se přidá síran měďnatý do koncentrace 20 μM , roztok se přefiltruje přes filtr s vylučovací mezí 0,45 μm a nanese na sloupec (1,05 cm – výška; 2,2 cm – průměr) obsahující 4ml lože náplně O Sepharose Fast Flow (Pharmacia) ekvilibrované s 10mM Tris o pH 6,8 až 7,0 při 4 °C. Po nanesení vzorku se sloupec promyje dvěma objemy sloupce stejného pufru. Průtok sloupcem je přibližně 1 ml/min. Při tomto postupu se pro selekci definovaných směsí izoforem erythropoietinu použije 6 oddělených kolon.

Kolony se promyjí 6 až 9 objemy sloupce pufru s nízkým pH, který se v případě kolony 1 skládá z 150mM kyseliny octové, 1mM glycinu, 20 μM síranu měďnatého a 6M močoviny, přičemž pH je hydroxidem sodným nastaveno na 4,7; v případě kolony 2 z 200mM kyseliny octové, 1mM glycinu, 20 μM síranu měďnatého a 6M močoviny, přičemž pH je hydroxidem sodným nastaveno na 4,7; v případě kolony 3 z 250mM kyseliny octové, 1mM glycinu, 20 μM síranu měďnatého a 6M močoviny, přičemž pH je hydroxidem sodným nastaveno na 4,7; v případě kolony 4 z 300mM kyseliny octové, 1mM glycinu, 20 μM síranu měďnatého a 6M močoviny, přičemž pH je hydroxidem sodným nastaveno na 4,7; v případě kolony 5 z 150mM kyseliny octové, 1mM glycinu, 20 μM síranu měďnatého a 6M močoviny a v případě kolony 6 z 300mM kyseliny octové, 1mM glycinu, 20 μM síranu měďnatého a 6M močoviny. Hodnota pH v kolonách se zvýší na asi pH 7 promytím každé kolony 8 až 11 objemy sloupce 10mM Tris-HCl, 55mM chloridu sodného, 20 μM síranu měďnatého o pH 7. Definované směsi izoforem erythropoietinu se eluují ze sloupců promytím 10mM Tris-HCl, 140mM chloridem sodným a 20 μM síranem měďnatým o pH 7,0.

Eluované izoformové produkty z každé kolony se zkoncentrují a rozpouštědlo se vymění za vodu za použití mikrokonzentrátoru Centricon-10 (Amicon). Výsledky analytické izoelektrické fokusace těchto zkoncentrovaných produktů jsou uvedeny na obr. 3. V gelových drahách 1 až 6 jsou v uvedeném pořadí obsaženy definované směsi izoforem erythropoietinu eluované ze sloupců 1 až 6. Směs izoforem obsažená v gelové dráze u levého okraje obr. 3 představuje buněčné médium aplikované na sloupec Q-Sepharose popsaný výše, přičemž sloupec je promyt 5mM kyselinou octovou, 1mM glycinem, 20 μM síranem měďnatým, 6M močovinou a směs izoforem erythropoietinu je eluována ze sloupce za použití výše popsaných postupů. Tato eluovaná směs izoforem se dále purifikuje způsoby popsanými ve výše citované publikaci Lai et al. před prováděním analytické izoelektrické fokusace.

Příklad 5

5 Frakcionace izoform rekombinantního erythropoietinu za použití gradientu s nízkou hodnotou pH na Q-Sepharose

Při dalším postupu se izoformy erythropoietinu dělí za použití gradientu s klesající hodnotou pH a stoupající iontovou silou. Koncentrované diafiltrované médium obsahující erythropoietin se nanese na sloupec Q-Sepharose v přibližném poměru 40 mg celkového proteinu na ml gelu.
 10 Potom se sloupec promyje přibližně 2 objemy sloupce 10mM Tris-HCl o pH 7,0 a následně přibližně 10 objemy sloupce 2mM kyseliny octové/1mM glycinu/20μM síranu měďnatého/6M močoviny (o pH přibližně 4,8), aby se odstranily kontaminační proteiny a izoformy erythropoietinu obsahující méně než asi 7 zbytků kyseliny sialové. Izoformy obsahující přibližně 8 až 12 zbytků kyseliny sialové se eluují ze sloupce za použití gradientu od přibližně 2mM kyseliny octové v 6M močoviny/1mM glycinu/20μM síranu měďnatém do 40mM kyseliny octové v 6M močoviny/1mM glycinu/20μM síranu měďnatém (o pH přibližně 4). Celkový objem gradientu je přibližně 40 objemů sloupce a sbírají se frakce o přibližném objemu jednoho sloupce do nádob obsahujících Tris pufr v objemu postačující pro úpravu pH na hodnotu v rozmezí od 6 do 8,5, aby se zabránilo dlouhodobé expozici zachycených frakcí nízké hodnotě pH. Dělení se monitoruje analytickou izoelektrickou fokusací alikvotních vzorků frakcí. Na obr. 4 je znázorněno dělení izoform 8 až 11, které lze tímto postupem provést. Izoformy 12 až 14, které zůstanou po skončení gradientova eluce vázány ke sloupci, se eluují promytím pufrům obsahujícím 10mM Tris-HCl, 140mM chlorid sodný a 20mM síran měďnatý (o pH 7,0). Izoformy (oddělené gradientovou elucí nebo eluované roztokem chloridu sodného) se zbaví kontaminačních proteinů chromatografií na obrácených fázích a následnou gelovou chromatografií (viz příklad 2 výše uvedené publikace Lai et al.).
 15
 20
 25

Příklad 6

30 Konstrukce analogů humánního erythropoietinu

Existující míst připojení uhlohydrátových zbytků v aminokyselinové sekvenci humánního erythropoietinu jsou uvedena na obr. 5 (SEQ ID NO: 26). Postupy, kterými se vytvářejí přídavná glykosylační místa v erythropoietinu, jsou souhrnně uvedeny na obr. 6A až 6C a jsou popsány dále.
 35

Pro použití při in vitro mutagenезi se syntetizují následující oligonukleotidové primery.

[Asn⁴, Ser⁶] EPO: 5' CGCCCACCAAACCTCAGCTGTGACAGCCGA 3'

(SEQ ID NO: 1)

[Asn⁹, Ser¹¹] EPO: 5' ATCTGTACAACCGAAGCCTGGAGAGGT 3'

(SEQ ID. NO: 2)

[Asn⁶⁹] EPO: 5' GGGCCTGGCCAAACCTGTCGGAAG 3' (SEQ ID. NO: 3)

[Asn¹²⁴] EPO: 5' TCCCCTCCAGATAATGCCTCAGCTGC 3' (SEQ ID. NO: 4)

[Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO: 5' CAGATGCGAACTCATCTGCTCCAC 3'

(SEQ ID. NO: 5)

[Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵] EPO: 5' AGGCCTGCAGGAATGGGAGCAGATGACCAGGTG 3'

(SEQ ID. NO: 6)

[Thr¹²⁵] EPO: 5' TCCAGATGCGACCTCAGCTGCTC 3' (SEQ ID. NO: 7)

[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO: 5' CCTCCAGATCCGACCTCAGCTGC 3'

(SEQ ID. NO: 8)

Podtržené kolony ukazují chybně párované oblasti, v nichž aminokyseliny uvedené v závorkách zahrnují aminokyseliny divokého typu.

- 5 Produkt [Asn⁴, Ser⁶]EPO se zkonstruuje za účelem zavedení přídavného N-glykosylačního místa do Asn 4. Produkt [Asn⁹, Ser¹¹]EPO se konstruuje za účelem zavedení přídavného N-glykosylačního místa do Asn 9. Produkt [Asn⁶⁹]EPO se zkonstruuje za účelem zavedení přídavného N-glykosylačního místa do Asn 69. Produkt [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO se zkonstruuje za účelem zavedení přídavného N-glykosylačního místa do Asn 125. Produkt [Thr¹²⁵]EPO a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO se zkonstruuji za účelem zavedení přídavného O-glykosylačního místa do Thr 125.

Pro použití při in vitro mutagenезi se syntetizují následující oligonukleotidové primery.

[Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO: 5' GGGCCTGGCCAACTGACAGAAGCTGTC 3'
(SEQ ID. NO: 9)

[Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹] EPO:
5' CAGGGCCTGTCCAACCTGACAGAAGCTGTC 3'
(SEQ ID. NO: 10)

[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO: 5' CAGATGCGAACTCAACGGCTCCAC 3'
(SEQ ID. NO: 11)

[Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹] EPO:
5'ATGCGAACTCAACGGCTCCACTCACAACAATCACT 3'
(SEQ ID. NO: 12)

[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO:
5' CCAGATCCAAATTCATCTGCTCCACTC 3'
(SEQ ID. NO: 13)

[Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷] EPO:
5' CCAGATCCAAATTCACAGCTCCACTC 3'
(SEQ ID. NO: 14)

[Thr¹²⁵, Thr¹²⁶] EPO: 5' CCAGATGCGACAACAGCTGCTCCA 3'
(SEQ ID. NO: 15)

[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹]EPO

5 Pomocí [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO cDNA, jako výchozí látky se oligonukleotidový primer 5'-AGATCCGACCACCGTGCTCCAC 3' (SEQ ID. NO: 16) převede na [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶]EPO. Oligonukleotidového primeru 5'-TGCTCCACTCACAACAATCACTG 3' (SEQ ID. NO: 17) se potom použije pro vytvoření [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹]EPO.

10 Produkty [Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO a [Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹]EPO se zkonstruují za účelem zavedení N-glykosylačního místa do Asn 69 a pro zvýšení stupně N-glykosylace v tomto místě. Produkty [Asn¹²⁵, Thr¹²⁷]EPO, [Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹]EPO, [Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷]EPO a [Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷]EPO se zkonstruují za účelem zavedení N-glykosylačního místa do Asn 125 a pro zvýšení stupně glykosylace v tomto místě. Produkty [Thr¹²⁵, Thr¹²⁶]EPO a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Ser¹³¹]EPO se zkonstruují za účelem zavedení přídatného O-glykosylačního místa do Thr¹²⁵ a za
15 účelem zvýšení glykosylace v tomto místě.

Zdrojem erythropoietinové DNA pro in vitro mutagenezi je plazmid Hu13, což je klon humánní erythropoietinové cDNA v pUC 8 (Law et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 6920 (1986)). Plazmidová DNA získaná z Hu13 se štěpí restriktčními enzymy BstEII a BglII, vzniklé fragmenty DNA se podrobí elektroforéze na agarosovém gelu a fragment erythropoietinové DNA o délce 810 bázových párů (bp) se izoluje z gelu za použití soupravy GeneClean^(R) a postupů poskytnutých výrobcem (BIO 101, Inc.). Plazmid pBRgHuEPO obsahuje genomový gen erythropoietinu, jakožto fragment BamHI vložený do derivátu pBR322 (použitý způsob je popsán ve výše citovaném patentu, původce Lin). pBRgHuEPO se také štěpí BstEII a BglII a izoluje se vektorový fragment o délce 6 517 bp. Ligací těchto dvou fragmentů se získá IGT1. Při konstrukci pEC-1 se pDSVL (který je popsán ve výše uvedeném Linově patentu a který je znázorněn na obr. 5B) štěpí BamHI a liguje se do něj izolovaný 2.8kb fragment BamHI s IGT1 obsahující erythropoietinovou cDNA.

Pro vytvoření jednořetězcové DNA pro in vitro mutagenezi se pEC-1 štěpí BamHI a BglII a izoluje se 820bp fragment erythropoietinové cDNA. Tento fragment se liguje do místa BamHI m13mp18 za vzniku m13-EC-1. Jednořetězcová DNA se získá ze supernatantů E. coli kmene RZ1032, který byl infikován m13-EC-1 způsobem popsaným v Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154, 367 (1987) a Messing, Methods in Enzymol 101, 20 (1983). Pro in vitro mutagenezi se přibližně 1 µg jednořetězcové DNA a 0.2 pmol jednoho ze syntetických primerů popsaných výše smíchá se 6 µl pufru (250mM Tris o pH 7,8, 50mM chlorid hořečnatý a 50mM dithiothreitol). Teplotní hybridizace primeru k templátu se provede tak, že se reakční objem doplní vodou do 10 µl, směs se 5 minut zahřívá na 65 °C a potom se nechá zchladnout na teplotu místnosti. Prodlužovací reakce se provede přidávkem vždy 2,5 µl dTTP, dATP, dGTP, dCTP a ATP (vždy o koncentraci 10µM) a následným přidávkem 1 µl (1 jednotky) E. coli DNA polymerázy (Klonowův fragment) a 1 µl (1 jednotky T4 DNA ligasy. Směs se inkubuje přes noc při 14 °C a použije se jí pro transformaci E. coli kmene JM109 (Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103 (1985)) způsobem popsaným ve výše uvedené Messingové publikaci.

Pro identifikaci mutantních klonů diferenciální hybridizací se plaky na živném agaru přenesou na filtry Gene Screen (New England Nuclear). Filtry se usuší pod infralampou a potom jednu hodinu inkubují v 6x SSC s obsahem 1% SDS při 60 °C. Pro hybridizaci se výše uvedený oligonukleotidový primer (8 pmol) označí na konci T4 polynukleotid kinázou a gamma ³²P-značeným ATP a inkubuje s filtry přes noc v 6x SSC, 0,5% SDS a 100mg/ml DNA lososího spermatu při 37 °C, za účelem mutace [Asn¹²⁴], při 55 °C, za účelem mutace [Asn⁴, Ser⁶], při 65 °C za účelem mutací [Thr¹²⁵] a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] a při 70 °C za účelem mutací [Asn⁹, Ser¹¹] a [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵]. Následující den se filtry třikrát promyjí 6x SSC při teplotě místnosti a provede se audiodiografie. Je-li to zapotřebí, promyjí se filtry 6x SSC při postupně se zvyšující teplotě, až již není pozorována žádná, nebo je pozorována jen malá hybridizace k plakům se sekvencí erythropoietinové cDNA divokého typu. Kolony poskytující pozitivní hybridizační signály za těchto podmínek se identifikují a retransfekují do JM109, za účelem izolace čistého kolonu. Dideoxyanalýza terminace řetězců ukazuje, že jsou přítomny mutace na asparaginový, serinový, threoninový a prolinový zbytek.

Vyvažovací metodou (Holmes et al., Anal. Biochem. 117, 193 (1981)) se z transfekovaných buněk JM109 získají dvouřetězcové m13 EC-1 DNA obsahující změny [Asn⁴, Ser⁶], [Asn⁹, Ser¹¹], [Asn⁶⁹], [Asn¹²⁴], [Asn¹²⁵], [Ser¹²⁷], [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵], [Thr¹²⁵] a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]. Tyto DNA se štěpí BstEII a XhoII a izolují se 810bp fragmenty erythropoietinové DNA. pEC-1 se štěpí BstEII a potom částečně BglII a 5'-konce výsledných fragmentů se defosforylují bakteriální alkalickou fosfatázou v 10mM Tris o pH 8 při 60 °C v průběhu 60 minut. Vektorový fragment o délce 7 kb, který neobsahuje 810bp fragment BstEII-BglII, se izoluje a liguje k erythropoietinovým fragmentům popsaným výše. Výsledné plazmidy (označené pEC-X, kde X je číslo analogu) obsahují DNA kódující analogy erythropoietinu se změnami aminokyselinovými zbytky v uvedených polohách.

Alternativně se zkonstruuje analog erythropoietinu (pEC34) in vitro mutagenezí, při níž se deletují aminokyselinové zbytky 41 až 55. Přitom vznikne menší (775 bp) fragment BstEII–BglII obsahující EPO. Tento fragment se výše uvedeným způsobem vloží do pEC1. Za účelem klonování analogů erythropoietinu se pEC34 štěpí BstEII, částečně štěpí BglII, defosforyluje a vektor se izoluje (tento způsob je popsán výše). Vektorový fragment o délce 7 kb se potom liguje k fragmentům erythropoietinu, jak je to popsáno výše. Klonování s pEC34 umožňuje snadné rozlišení mezi rekombinanty a jednoduchým novým uzavřením. Pouhým novým uzavřením vzniká menší fragment BstEII–BglII než jsou analogy, což lze snadno rozlišit na agarosovém gelu.

Těchto obecných postupů se použije pro konstrukci analogů erythropoietinu, které jsou uvedeny v tabulkách 3, 4 a 5. U každého analogu jsou uvedeny změny sekvence DNA; jinak mají oligonukleotidové primery použité na mutagenezi sekvenci, která je komplementární k humánnímu erythropoietinu.

T a b u l k a 3

Analogy erythropoietinu s místy pro N-vázané uhlohydrátové
řetězce

Analog číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
N1	Asn ⁴ Ser ⁶	CGC→AAC ATC→AGC
N2	Asn ⁹ Ser ¹¹	AGC→AAC GTC→AGC
N3	Asn ¹⁹ Thr ²¹	GCC→AAC GAG→ACG
N4	Asn ³⁰ Thr ³²	GCT→AAT CAC→ACG
N5	Asn ⁴²	CCA→AAT
N6	Ser ⁴² Asn ⁴³ Thr ⁴⁵	CCA→TCA GAC→AAC AAA→ACA
N7	Ser ⁴⁹	TAT→TCT
N8	Asn ⁵¹ Thr ⁵³	TGG→AAT AGG→ACG
N9	Asn ⁵⁷ Thr ⁵⁹	GGG→AAC CAG→ACG
N10	Asn ⁶⁹	CTG→AAC
N11	Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹	CTG→AAC TCG→ACA
N12	Ser ⁶⁸ Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹	N11 plus GCC→TCC
N13	Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	TGG→AAT CCC→ACC
N14	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	N13 plus CCG→TCG
N15	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ Thr ⁹²	N14 plus CAG→ACG

T a b u l k a 3 (pokračování)

Analogy erythropoietinu s místy pro N-vázané uhlohydrátové
řetězce

Analog číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
N16	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ Ala ¹⁶²	N14 plus AGG→GCG
N17	Asn ⁸⁸ Ser ⁹⁰	TGG→AAT CCC→TCC
N18	Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	CCG→GTG TGG→AAT CCC→ACC
N19	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Gly ⁸⁹ Thr ⁹⁰	CCG→TCG TGG→AAT GAG→GGG CCC→ACC
N20	Asn ⁸⁹ Ile ⁹⁰ Thr ⁹¹	GAG→AAC CCC→ATC CTG→ACG
N21	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁹ Ile ⁹⁰ Thr ⁹¹	N20 plus CCG→TCG
N22	Asn ¹¹³ Thr ¹¹⁵	GGA→AAC CAG→ACG
N23	Asn ¹¹⁸ Val ¹²¹	GCC→AAC CCT→GTT
N24	Asn ¹²¹ Ser ¹²² Thr ¹²³	CCT→AAT CCA→TCA GAT→ACT
N25	Asn ¹²⁴	GCG→AAT
N26	Ser ¹²² Asn ¹²⁴	CCA→TCA GCG→AAC
N27	Asn ¹²⁵ Ser ¹²⁷	GCC→AAC GCT→TCT
N28	Asn ¹²⁵ Thr ¹²⁷	GCC→AAC GCT→ACG

T a b u l k a 3 (pokračování)

Analogy erythropoietinu s místy pro N-vázané uhlohydrátové
řetězce

Analóg číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
N29	Leu ¹²¹ Ser ¹²² Asn ¹²⁵ Thr ¹²⁷	N28 plus CCT→CTT
N30	Thr ¹²⁰ Gly ¹²² Leu ¹²³ Asn ¹²⁵ Thr ¹²⁷	CCA→TCA N28 plus TCC→ACC CGC→GGG GAT→CTC
N31	Asn ¹²⁶ Ser ¹²⁸	TCA→AAT GCT→TCT
N32	Asn ¹²⁶ Thr ¹²⁸ Val ¹²⁹	TCA→AAT GCT→ACT CCA→GTA
N33	Leu ¹²¹ Ser ¹²² Asn ¹²⁶ Thr ¹²⁸ Val ¹²⁹	N32 plus CCT→CTT CCA→TCA
N34	Thr ¹²¹ Gly ¹²³ Ser ¹²⁵ Asn ¹²⁶ Thr ¹²⁸ Val ¹²⁹	N32 plus CCT→ACG GAT→GGG GCC→TCC
N35	Ser ¹²⁹ Asn ¹³⁰	CCA→AGC CTC→AAC
N36	Asn ¹³²	ACA→AAC
N37	Asn ¹³⁴ Thr ¹³⁶	ACT→AAT GAC→ACC
N38	Asn ¹³⁵	GCT→AAT
N39	Asn ¹³⁶ Thr ¹³⁸	GAC→AAC TTC→ACC
N40	Asn ¹³⁷ Thr ¹³⁹	ACT→AAT CGC→ACC
N41	Asn ¹³⁸ Thr ¹⁴⁰	TTC→AAC AAA→ACA

T a b u l k a 3 (pokračování)

Analogy erythropoietinu s místy pro N-vázané uhlohydrátové
řetězce

Analog číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
N42	Asn ¹⁴⁴	GTC→AAC
N43	Ser ¹⁴³ Thr ¹⁴⁹ Val ¹⁵⁰	TTC→TCC CTC→ACC CGG→GTG
N44	Gly ¹⁴⁸ Thr ¹⁴⁹	TTC→GGC CTC→ACC
N45	Asn ¹⁵⁵	CTG→AAT
N46	Asn ¹⁶³ Ser ¹⁶⁵	ACA→AAT
N47	Asn ³⁰ Thr ³² Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	N4 a N18
N48	Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	N11 a N14

T a b u l k a 4

Analogy erythropoietinu s místy pro O-vázané uhlohydrátové
řetězce

Analóg číslo	Substituční aminokyselin	Změny v sekvenci
01	Ser ⁶	ATC→AGC
02	Ser ⁷	TGT→TCC
03	Ser ⁸	GAC→AGC
04	Ser ¹¹	GTC→TCT
05	Ser ¹⁸	GAG→TCG
06	Ser ²³	GAG→TCG
07	Ser ²⁹	TGT→AGC
08	Ser ²⁹	TGT→TCT
09	Ser ³⁰	GCT→TCT
010	Ser ³³	TGC→TCA
011	Ser ³⁷	GAG→TCG
012	Ser ⁴⁹	TAT→TCT
013	Ser ⁶¹	GTA→TCA
014	Ser ⁶³	GTC→TCC
015	Ser ⁶⁷	CTG→TCG
016	Ser ⁶⁸	GCC→TCC
017	Ser ⁷⁰	CTG→TCG
018	Ser ⁷³	GCT→TCT
019	Ser ⁷⁴	GTC→TCT
020	Ser ⁷⁵	CTG→TCG
021	Ser ⁷⁹	GCC→TCC
022	Ser ⁸¹	TTG→TCG
023	Ser ⁸⁶	CAG→TCG
024	Ser ⁸⁷	CCG→TCG
025	Ser ⁹³	CTG→TCG
026	Ser ⁹⁸	GCC→TCC
027	Ser ⁹⁹	GTC→TCC
028	Ser ¹⁰²	CTT→TCT
029	Ser ¹⁰³	CGC→AGT

T a b u l k a 4 (pokračování)

Analogy erythropoietinu s místy pro O-vázané uhlohydrátové
řetězce

Analog číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
030	Ser105	CTC→AGC
031	Ser109	CTT→TCT
032	Ser111	GCT→TCT
033	Ser112	CTG→TCG
034	Ser114	GCC→TCC
035	Ser128	GCT→TCT
036	Ser159	TCG→GAG
037	Ser161	TGC→TCC
038	Pro125Ser127	GCC→CCC GCT→TCT
039	Thr62	GAA→ACA
040	Thr64	TGG→ACG
041	Thr65	CAG→ACG
042	Thr88	TGG→ACG
043	Thr90	CCC→ACC
044	Thr92	CAG→ACG
045	Thr100	AGT→ACT
046	Thr110	CGG→ACG
047	Thr115	CAG→ACG
048	Thr123	GAT→ACT
049	Thr124	GCG→ACG
050	Thr125	GCC→ACC
051	Thr125Ser127	GCC→ACC GCT→TCT
052	Thr125Thr126	GCC→ACA TCA→ACA
053	Thr126	TCA→ACC
054	Thr127	GCT→ACT
055	Thr130	CTC→ACC

T a b u l k a 4 (pokračování)

Analogy erythropoietinu s místy pro O-vázané uhlohydrátové řetězce

Analog číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
056	Thr ¹³¹	CGA→ACA
057	Thr ¹³⁶	GAC→ACC
058	Thr ¹⁴⁰	AAA→ACA
059	Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵	GCG→CCG GCC→ACC
060	Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵ Thr ¹²⁶	059 plus TCA→ACC
061	Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵ Thr ¹²⁶ Thr ¹³¹	060 plus CGA→ACA
062	HCG C-terminální prodloužení	

5 Tabulka 5

Analogy erythropoietinu s místy pro N- a O-vázané uhlohydrátové řetězce

Analog číslo	Substituce aminokyselin	Změny v sekvenci
NO1	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	N14 a 062
NO2	HCG C-terminální prodloužení Asn ³⁰ Thr ³² Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ HCG C-terminální prodloužení	N47 a 062

- 10 Plazmidy označené pDEC-X (kde X představuje číslo analogu) se zkonstruují insercí erythropoietinové cDNA do pDECdelta, který je derivátem plazmidu pDSα2. Expresní vektor pDSα2 je obecně popsán v mezinárodní přihlášce PCT WO90/14363. pDECdelta se získá z pDSα2 následujícím sledem stupňů:
- 15 1) Místo HindIII v pDSα2 se deletuje štěpením pDSα2 DNA HindIII, na lepivé konce HindIII se působí E. coli DNA polymerázou (Klenowův fragment) a jednotlivými dNTP a provede se religace vektoru s tupými konci. Získá se plazmid pDSα2deltaH.
- 20 2) pDSα2deltaH se rozštěpí Sall a liguje se k němu syntetický oligonukleotid obsahující sestřižený signál SV40 s Sall linkerem připojeným k 3'-konci sestřiženého signálu. Syntetický oligonukleotid má následující sekvence (SEQ ID. NO: 18):

5' TCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT
 CTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCA
 AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG
 AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAACAAGCTGGTCGACC 3'

Výsledným plazmidem je sestřih pDS α IIdeltaH.

5 3) Sestřih pDS α IIdeltaH se štěpí SalI a jeho konce se otupí tím, že se na lepidivé konce působí T4 DNA polymerázou a jednotlivými dNTP. Stejnou metodou se otupí konce 820 bp fragmentu BamHI-BglII erythropoietinové cDNA a provede se ligace k plazmidu. Získá se plazmid pDEC-1.

10 4) Plazmid pDEC se rozštěpí KpnI a PvuII a jeho konce se otupí tím, že se na lepidivé konce působí nukleasou z bobu „Mung“. Plazmid se religuje za účelem delece vyšťipnutého fragmentu KpnI-PvuII, čímž vznikne plazmid pDECdelta.

15 Plazmidy pDEC-X se získají z pDECdelta úplným rozštěpením BstEII a potom částečným rozštěpením GblII. Vektorový fragment neobsahující erythropoietinové kódující sekvence se izoluje a liguje k 810bp fragmentu BstEII – BglII obsahujícím požadovaný plazmid.

20 Podrobnosti konstrukce některých analogů obsahujících několik aminokyselinových změn jsou popsány dále.

Konstrukce pDEC(N47) a pDEC(N48)

25 pDEC(N47), který obsahuje mutace Asn30 Thr32 Val187 Asn88 a Thr90 se zkonstruuje z pDEC(N18) a pDEC(N4). pDEC(N18) se rozštěpí HindII a BglII a izoluje se 445bp fragment. pDEC(N4) se rozštěpí BstEI a HindII a izoluje se 377bp fragment. Tyto dva fragmenty se ligují po pDECdelta rozštěpeného BstEII a BglII způsobem popsaným výše za vzniku pDEC(N47).

30 pDEC(N48), který obsahuje mutace Asn69 Thr71 Ser87 Asn88 a Thr90 se zkonstruuje z pDEC(N14) a pDEC(N11). pDEC(N14) se rozštěpí HindII a BglII a izoluje se 445bp fragment. pDEC(N11) se rozštěpí BstEII a HindIII a izoluje se 377bp fragment. Tyto dva fragmenty se ligují po pDECdelta rozštěpeného BstEII a BglII způsobem popsaným výše za vzniku pDEC(N48).

Konstrukce pDEC(062) (fúze HCG-erythropoietin)

35 pDEC (062) se složí z pECI a 107bp StuI-BglII linkeru ze syntetické DNA, který obsahuje 28 karboxy-terminálních aminokyselin z humánního chorionického gonotropinu (Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln) (SEQ ID. NO: 25) (Pierce et al. Ann. Rew, Biochem. 50, 465 (1981)).
 40 Tento linker má následující sekvenci

5' CCTGTAGGACAGGGGACAGATCCTCTTCCTCAAAGGCCCTCCCCCAGCCTTC-
 3' GGACATCCTGTCCCCTGTCTAGGAGAAGGAGTTTCCGGGGAGGGGGGTCCGAAG-

5' CAAGTCCATCCCGACTCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAATGA
 (SEQ ID. NO: 19)

3' GTTCAGGTAGGGCTGAGGGCCCCGGGAGCCTGTGGGGCTAGGAGGGTGTACTCTAG
 (SEQ ID. NO: 20)

pECI se rozštěpí StuI a GblII a izoluje se 610 bp fragment DNA. Tento syntetický linker se fosforyluje ATP a polynukleotidkinázou a liguje s fragmentem pECI do pDECdelta před tím rozštěpeného BstEII a částečně rozštěpeného BglII způsobem popsáným výše.

5

Konstrukce pDEC(NO1)

pDEC(NO1) se zkonstruuje složením pDEC(062) (HCG-EPO) a pDEC(N14) (Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰). pDEC177 se rozštěpí StuI a BglII a pomocí GeneClean^(R) se izoluje 610bp fragment DNA obsahující mutace Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰. pDEC(062) se rozštěpí StuI a GblII a izoluje se fragment o délce 107 bp. Tyto dva fragmenty DNA se ligují do pDECdelta předtím rozštěpeného BstEII a částečně rozštěpeného BglII způsobem popsáným výše.

10

Konstrukce pDEC(NO2)

15

pDEC(NO2) se zkonstruuje složením pDEC(062) (HCG-EPO) a pDEC(N47) (Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰). pDEC(N47) se rozštěpí StuI a BglII a pomocí GeneClean^(R) se izoluje 610bp fragment DNA obsahující mutace Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰. pDEC(062) se rozštěpí StuI a GblII a izoluje se fragment o délce 107 bp. Tyto dva fragmenty DNA se ligují do pDECdelta předtím rozštěpeného BstEII a částečně rozštěpeného BglII způsobem popsáným výše.

20

Konstrukce pDEC(NO16) Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²

pDEC(N16) se zkonstruuje složením pDEC(N14) (Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰) a pDEC258 (Ala¹⁶²). pDEC258 se zkonstruuje za použití výše popsáných způsobů mutagenese in vitro a v poloze 162 se kodon AGG vymění za kodon GCG. pDEC(N14) se rozštěpí StuI a GblII a pomocí GeneClean^(R) se izoluje 610bp fragment DNA obsahující mutace Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰. pDEC(258) se rozštěpí StuI a GblII a izoluje se fragment o délce 210 bp. Tyto dva fragmenty DNA se ligují do pDECdelta předtím rozštěpeného BstEII a částečně rozštěpeného BglII způsobem popsáným výše.

30

Konstrukce pDEC(R1), (R2) a (R3)

Pro odstranění glykosylačních míst z pDEC(N14) se m13-EPO(N14) obsahující mutace Ser⁸⁷, Asn⁸⁸ a Thr⁹⁰ podrobí in vitro mutagenesi popsané výše za použití následujících primerů

35

5 'GGAGGCCGAGCAGATCACGACGG3' GLN24

(SEQ ID. NO: 21)

5 'CTTGAATGAGCAGATCACTGTCC3' GLN38

(SEQ ID. NO: 22)

5 'CTGTTGGTCCAGTCTTCCCAG3' GLN83

(SEQ ID. NO: 23)

Výsledné plazmidy se označí pDEC(R1) (Gln²⁴Ser⁸⁷,Asn⁸⁸Thr⁹⁰, pDEC(R2) (Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰) a pDEC(R3) (Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰). m13EC-1 se také podrobí in vitro mutagenezi za použití výše uvedených oligonukleotidových primerů, a získají se tak pEC10 (Gln²⁴) a pEC8 (Gln³⁸). pEC9 (Gln⁸³) se zkonstruuje za použití následujícího primeru.

5 'CCTGTTGGTCCAGTCTTCCCAGC3' GLN83

(SEQ ID. NO: 24)

Klony cDNA humánního erythropoietinu a analogy odpovídající [Asn⁴, Ser⁶]EPO, [Asn⁹, Ser¹¹]EPO, [Asn⁶⁹]EPO, [Asn¹²⁴]EPO, [Asn¹²⁵,Ser¹²⁷]EPO, [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵]EPO, [Thr¹²⁵]EPO a [Pro¹²⁴,Thr¹²⁵]EPO a klony cDNA analogů popsaných v tabulkách 3, 4 a 5 se elektroporací přenesou do buněk COS-1 (ATCC č. CRL-1650). Buňky COS-1 se sklídí z semi-konfluentních misek, promyjí médiem (Dulbeccovo modifikované esenciální médium obsahující 5 % fetálního telecího séra a 1 % l-glutaminu/penicilinu/streptomycinu (Irvine Scientific) a resuspendují na koncentraci 4 x 10⁶ buněk/ml. Jeden ml buněk se přenesou do elektroporační kyvety (Bio-Rad). Elektroporace se provádí pomocí zařízení Bio-Rad Gene Pulser při kapacitě 25 µF a napětí 1600 V za přítomnosti 100 až 200 µg nosičové DNA a 2 až 2 µg plazmidové DNA kódující erythropoietinový analog. Elektroporované buňky se přenesou do misek v množství 2 x 10⁶ buněk na misku pro kultivaci tkání o průměru 60 mm s 5 ml média. 2 až 4 hodiny po přenesení do misek se médium nahradí 5 ml čerstvého média. Médium upravené buňkami se oddělí 3 až 5 dnů po elektroporaci.

Příklad 7

Charakterizace analogů erythropoietinu

A. Stanovení adice uhlohydrátu

Objem supernatantu obsahující 5 až 21 jednotka z buněk COS transfekovaných jednotlivými cDNA erythropoietinových analogů popsanými v příkladu 6 se přes noc při teplotě místnosti imunoprecipituje králičí protierthropoietinovou polyklonální protilátkou. 20 až 80 µl 1 : 1 Protein A-Sepharose v fosfátem pufrovaném roztoku chloridu sodného (PBS) se přidá k imunoprecipitátu a směs se 1 hodinu inkubuje při teplotě místnosti. Vzorky se odstředí, promyjí PBS a tam, kde je to uvedeno, se peleta zpracuje N-glykanázou, aby se odstranily N-vázané uhlohydrátové řetězce. Vzorky se analyzují elektroforézou na 15% SDS-polyakrylamidovém gelu, provede se přenos na nitrocelulózu a analýza Western popsaná v Burnette et al., Anal. Biochem. 112, 195 až 203 (1981) a Elliott et al., Gene 79, 167 až 180 (1989) za použití směsi myších anti-erythropoietinových monoklonálních protilátek. Jedna z takových protilátek, 9G8A, je popsána v Elliott et al. (1979) Bood 74, Supp. 1, A. 1228.

- Analýza supernatantů buněk COS transfekovaných [Asn⁶⁹]EPO cDNA a [Asn¹²⁵,Ser¹²⁷]EPO cDNA ukazuje, že proteiny mají větší velikost než erythropoietin s humánní sekvencí. Tato zvětšená velikost ukazuje na přítomnost přídavného N-vázaného uhlohydrátového řetězce (obr. 7). Zpracování supernatantů buněk COS transfekovaných cDNA [Thr¹²⁵]EPO a cDNA [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO N-glykanázou ukazuje, že proteiny mají větší velikost ve srovnání s erythropoietinem s humánní sekvencí. Tato zvětšená velikost ukazuje, že je přítomen přídavný O-vázaný uhlohydrátový řetězec (obr. 8). Analýza Western blot jiných vybraných analogů je uvedena na obr. 10.
- Pro stanovení počtu N-vázaných uhlohydrátových řetězců, které jsou připojeny k EPO, se provede částečně rozštěpení N-glykanázou. Analogy rHuEPO se exprimují v buňkách CHO a oddělí se zpracované médium neobsahující sérum. Zkumavky obsahují 40 jednotek EPO (objem je nastaven vodou na 15 µl). Do každé zkumavky se přidá 10 µl 0,5% SDS a vzorky se 3 hodiny vaří. Potom se ke každému vzorku přidají tyto složky: 10,8 µl 0,5M fosforečnanu sodného o pH 8,6, 5 µl 7,5= Nonidetu P40 a 1,5 µl roztoku N-glykanázy (Genzyme) o koncentraci 250 jednotek/ml. Vzorky se inkubují uvedenou dobu při 37 °C. Reakce se zastaví přidáním vzorkového pufru SDS-PAGE (viz výše) a potom podrobí analýze Western na SDS-PAGE (10 % akrylamidu) za použití anti-EPO polyklonální protilátky a anti-králíčí soustavy Wewstastain^(R) (Vector Laboratories) a 4-chlornaftolu, jako substrátu. Analýza N-vázaných řetězců za použití této metody je pro humánní erythropoietin a analog N14 znázorněna na obr. 11.

B. Stanovení účinnosti analogů erythropoietinu

- Provedou se radioimunoeseje (RIA) způsobem popsaným ve výše uvedené publikaci Egrie et al. Stanovení EIA se provádějí za použití soupravy EIA Clinigen^(R) (Systémy R a D), přičemž se pracuje podle postupů dodaných výrobcem. Biologická účinnost in vivo analogů erythropoietinu se stanovuje na supernatantech získaných z buněk CHO exprimujících analog erythropoietinu nebo na purifikovaném erythropoietinu získaném z média zpracovaného buňkami CHO způsobem popsaným dále za použití exhypoxického polycythemického myšího biologického stanovení (Cotes et al., výše uvedená citace).

- Účinnost erythropoietinu in vitro se stanoví zkouškou tvorby erythroidní kolonie, kterou popsali Iscove et al., J. Cell. Physiol. 83, 309 až 320 (1974); zkouška je modifikována. Mononukleované buňky z buněk humánní kostní dřene se částečně purifikují na „ficoll-paque cushion“, promyjí se Iscoveho médiem, aby se odstranily ulpělé buňky, a potom se nanosou na misky. Kultivační médium obsahuje 0,9 % methylcelulózy a neobsahuje žádný hovězí sérový albumin. Erythroidní kolonie se zjišťují po 8 až 10 dnech kultivace.

- Analogy erythropoietinu transfekované a exprimované v buňkách COS způsobem popsaným v příkladu 6 se analyzují v surových supernatantech buněk COS za použití RIA, EIA a stanovení s tvorbou erythroidní kolonie. Purifikovaný erythropoietin s humánní sekvencí vykazuje in vitro účinnost, která je srovnatelná s účinností podle RIA stanovenou při výše uvedených zkouškách. Analogy [Asn⁶⁹]EPO, [Thr¹²⁵]EPO a [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵]EPO vykazují in vitro účinnost, která je srovnatelná s účinností podle RIA a poskytují důkaz, že obsahují přídavné uhlohydrátové řetězce (podle stanovení uvedeného v části A). [Thr¹²⁵]EPO a analogy N4, N11, N14, N16, N18, N47, N48, 062, NO1 a NO2 se dále analyzují tak, že se klon cDNA kódující analog erythropoietinu transfekuje do buněk CHO a supernatanty buněk CHO se podrobí stanovení RIA nebo EIA a biologickému stanovení in vivo. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6. Účinnost in vivo analogů R1, R2 a R3 exprimovaných v supernatantech buněk CHO jsou uvedeny v tabulce 7.

T a b u l k a 6

Analogy erythropoietinu obsahující přídavné uhlohydrátové
řetězce

Sekvence EPO	N-vázané řetězce ^a	O-vázané řetězce	Účinnost in vivo RIA nebo EIA
	3 ^c	1 ^d	0,6
Asn ³⁰ Thr ³²	3 až 4 ^c	n.t.	1,1
Asn ⁵¹ Thr ⁵³	4	n.t.	n.t.
Asn ⁵⁷ Thr ⁵⁹	4	n.t.	n.t.
Asn ⁶⁹	4	sniž.mn. ^e	n.t.
Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹	4	n.t.	0,25-0,7
Ser ⁶⁸ Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹	4	n.t.	n.t.
Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	4 ^c	n.t.	1,8
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	3 až 4 ^c	normální	1,0
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Gly ⁸⁹ Thr ⁹⁰	4	n.t.	n.t.
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ Thr ⁹²	4	sniž.mn. ^e	n.t.
Asn ⁸⁹ Ile ⁹⁰ Thr ⁹¹	4	n.t.	n.t.
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁹ Ile ⁹⁰ Thr ⁹¹	4	n.t.	n.t.
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ Ala ¹⁶²	4	n.t.	1,8
Asn ¹³⁶ Thr ¹³⁸	3 až 4	n.t.	n.t.
Asn ¹³⁸ Thr ¹⁴⁰	3 až 4	n.t.	n.t.
Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	4 až 5	n.t.	0,025-0,25
Asn ³⁰ Thr ³² Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	4 až 5 ^c	normální	1,8
Thr ¹²³	3	1 a 2 ^f	n.t.
Thr ¹²⁵	3	1 a 2 ^f	0,7
Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵	3	1 a 2 ^f	n.t.
HCG C- terminální prodloužení	3	alespoň 39	1,0-1,3
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ HCG prodloužení	4	alespoň 39	1,5
Asn ³⁰ Thr ³² Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ HCG prodloužení	4 až 5	alespoň 39	0,8

Poznámky k tabulce 6:

^aPočet přidavných N-vázaných řetězců se odhaduje na základě mobility peptidových analogů v SDS gelech způsobem popsaným v příkladu 7A.

^bPoměr účinnosti analogu in vivo k množství analogu erythropoietinu. Měření účinnosti se provádějí na supernatantech buněk CHO s analogy za použití myšího polycythemického biologického stanovení. Množství analogu erythropoietinu v supernatantech buněk CHO se stanovuje zkouškou RIA nebo EIA popsanou v textu.

^cPočet přidavných uhlohydrátových řetězců se potvrdí zkouškou migrace glykoproteinu v SDS-gelech po částečném rozštěpení N-glykanázou způsobem popsaným v příkladu 7A.

^dO-vázaný řetězec v Ser¹²⁶ je přítomen na 70 % molekul humánního erythropoietinu.

^eAnalogy se sníženým stupněm O-glykosylace, které obsahují uhlohydrátový řetězec v Ser¹²⁶ na méně než 70 % molekul.

^fThr¹²³EPO obsahuje dva O-vázané řetězce na více než 60 % molekul. Thr¹²⁵EPO obsahuje dva O-vázané řetězce na přibližně 40 % molekul. Pro¹²⁴Thr¹²⁵EPO obsahuje dva O-vázané řetězce na více než 80 % molekul.

^gTyto analogy obsahují alespoň tři O-vázané řetězce a mohou mít i čtyři nebo pět řetězců. O samotném HCG je známo, že obsahuje čtyři O-vázané řetězce.

n.t. znamená, že zkoušení nebylo prováděno.

Tabulka 7

Účinnost humánního erythropoietinu a analogů obsahujících přesmyky uhlohydrátových míst

Sekvence EPO	N-vázané řetězce	Účinnost in vivo RIA nebo EIA
	3	0,69
Gln ²⁴	2	0,16
Gln ³⁸	2	0,16
Gln ⁸³	2	0,23
Gln ²⁴ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ (R1)	3	0,69
Gln ³⁸ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ (R2)	3	0,41
Gln ⁸³ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ (R3)	3	0,50
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	3 až 4	1,48

Poměr účinnosti in vivo k RIA nebo EIA se stanovuje způsobem popsaným v poznámce ^a k tabulce 6.

C. Výroba izomorfních směsí získaných z analogů erythropoietinu

[Thr¹²⁵]EPO (EPO 050)

Analog erythropoietinu, [Thr¹²⁵]EPO, se zkonstruuje způsobem popsaným v části A. příkladu 6. 810bp fragment erythropoietinové cDNA nesoucí [THR¹²⁵]mutaci se izoluje rozštěpením plazmidu pEC obsahující [Thr¹²⁵] mutaci pomocí BstEII a BglII a ligací vzniklého fragmentu k pDECdelta (derivát pDSα2) (viz příklad 6).

Plazmid pDECdelta obsahující [Thr¹²⁵] erythropoietinovou cDNA se transfekuje do DHFR-deficientních buněk CHO. 770 ml média zpracovaného buňkami CHO se zkoncentruje za použití membrány s vylučovací mezí molekulové hmotnosti 10 000 dalton a diafiltruje proti 10mM Tris-HCl o pH 8,6 do dosažení konečného objemu 34 ml. Alikvot vzniklého koncentrátu o objemu 17 ml se nanese na sloupec Q-Sepharose s rychlým průtokem (objem lože 5 ml), který je ekvilibrován ve stejném pufru. Eluce se provádí lineárním gradientem od 0 do 250mM chloridu sodného v 10mM Tris-HCl o pH 8,6. Alikvoty frakcí eluovaných ze sloupce, buď neupravené, nebo štěpené N-glykanázou se analyzují SDS-PAGE neb IEF a spojí se příslušné frakce podle obsahu izoform a/nebo uhlohydrátu, přičemž vzniklé směsi se označí čísla 2, 3 a 4. Každá směs se nanese na sloupec Vydac C4 (214TPB 2030; průměr 1 cm; objem lože 1,8 až 2,5 ml; průtok 0,34 ml/min). Sloupec se promyje vždy 2 objemy sloupce 20% ethanolu v 10mM Tris-HCl o pH 7,0. Sloupec se eluují lineárními gradienty 20 až 94% ethanolu v 10mM Tris-HCl o pH 7,0. Vyrobit se směsi 2, 3 a 4, tyto směsi se zředí 1mM Tris-HCl o pH 7,0 a nanese na sloupec Q-Sepharose s rychlým průtokem. Po promytí 10mM Tris-HCl o pH 7,0 se vzorky eluují 20mM citranem sodným/250mM chloridem sodným o pH 7,0. Purifikované [Thr¹²⁵] směsi se analyzují výše uvedeným způsobem (Cotes et al.) na biologickou účinnost. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

[Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰]EPO (EPO N14)

Preparativní postup 1

Analog EPO N14 se purifikuje třístupňovým postupem, který zahrnuje ionexovou chromatografii, chromatografii na obrácených fázích a gelovou filtrační chromatografii. Během stupně ionexové chromatografie se spojí vhodné frakce za účelem získání směsi izoform s vysokým obsahem kyseliny sialové. Dvě další směsi se vyrobí při chromatografii na obrácených fázích s obsahem analogu s agregátem nebo bez něho. Podrobnosti tohoto purifikačního stupně jsou uvedeny dále.

1. Médium upravené buňkami CHO exprimujícími analog EPO N14 se sklídí a přibližně 2,5násobně zkoncentruje za použití míchané kyvety s membránou YM10 (Amicon) a diafiltruje proti 10mM Tris o pH 8,5.
2. Zkoncentrované médium se nanese při asi 12 A₂₈₀/ml pryskyřice na sloupec Q-Sepharose FF (Pharmacia) ekvilibrováný v 10mM Tris o pH 8,5 při průtoku 0,2 cm/min.
3. Po nanesení média se sloupec promyje třemi objemy sloupce 10mM Tris o pH 8,5 a eluuje 50 objemy sloupce gradientu od 0 do 0,5M chloridu sodného v 10mM Tris o pH 8,5. Sbírají se frakce, jejichž objem odpovídá objemu sloupce.
4. Vzorek každé frakce se zkouší na IEF gelu při pH 3 až 5. Na základě rozdělení izoform zjištěného metodou IEF se spojí takové frakce, aby vzniklá směs obsahovala převážně izoformy 11 až 18. K této směsi se přidá EDTA do 1mM výsledné koncentrace.
5. Směs izoform se nanese při asi 5 A₂₈₀/ml pryskyřice na sloupec s obrácenými fázemi C4 (Vydac) ekvilibrováný ve 20% ethanolu v 10mM Tris o pH 7,0 při průtokové rychlosti 2,5 cm/min. Sloupec se promyje jedním objemem sloupce 20% ethanolu v 10mM Tris o pH 7,0 a eluuje 30 objemy sloupce gradientu od 20 do 94% ethanolu v 10mM Tris o pH 7,0 při průtokové rychlosti 1 cm/min. Sbírají se frakce o objemu odpovídajícím 0,2 objemu sloupce.
6. Vzorek každé frakce se analyzuje pomocí neredukujícího 12% DDS-PAGE. Na základě přítomnosti agregátu pozorovaného na SDS-gelu se vytvoří dvě oddělené směsi. Směs č. 1 obsahuje analog EPO, ale žádný agregát, a směs č. 2 obsahuje jak analog EPO, tak agregát.

7. Směs č. 1 se přibližně 65násobně zkoncentruje a směs č. 2 se přibližně 250násobně zkoncentruje za použití zařízení Centricon 10 (Amicon). U každé směsi se provede výměna pufru za 20mM citran sodný/100mM chlorid sodný o pH 7,0.
- 5 8. Každá směs se individuálně purifikuje na sloupci HPLC BioSil SEC-250 (BioRad) ekvilibrované ve 20mM citranu sodném/100mM chloridu sodného o pH 7,0. Směsi se nanasou při teplotě nižší než 6 A₂₈₀/ml pryskyřice při průtokové rychlosti 2,26 cm/min. Při každé zkoušce se sbírají píkove frakce odpovídající monomerním analogům.
- 10 9. Změří se absorbance každé směsi a část každé směsi se zkoncentruje pro analýzu gelu SDS-PAGE a IEF. Směs č. 1 obsahuje izoformy 15 až 17 a použije se ji pro farmakokinetické studie a studie vazby k receptoru.
- 15 **Preparativní postup 2**
- Podobně se purifikuje analog EPO N14 třístupňovým postupem, který zahrnuje ionexovou chromatografii, vysoce účinnou chromatografii na obrácených fázích a chromatografii na hydroxylapatitu. Během stupně ionexové chromatografie se analog rozdělí do tří směsí obsahujících podle obsahu izoformem. Podrobnosti tohoto purifikačního stupně jsou uvedeny dále.
- 20 1. Supernatant buněk CHO exprimujících analog EPO N14 se oddělí a přibližně 10x zkoncentruje za použití zařízení Filtron MiniUltrasette s tangenciálním tokem a potom diafiltruje proti 10mM Tris o pH 8,5.
- 25 2. Zkoncentrované médium se nanese při asi 10 A₂₈₀/ml pryskyřice na sloupec Q-Sepharose FF (Pharmacia) ekvilibrovaný v 10mM Tris o pH 8,5 při průtoku 0,2 cm/min.
- 30 3. Po nanesení média na sloupec promyje třemi objemy sloupce 10mM Tris o pH 8,5 a eluuje 50 objemy sloupce gradientu od 0 do 0,5M chloridu sodného v 10mM Tris o pH 8,5. Sbírají se frakce, jejich objem odpovídá objemu sloupce.
- 35 4. Vzorek každé frakce se zkouší na IEF gelu při pH 3 až 5. Na základě rozdělení izoformem zjištěného metodou EIF se jednotlivé frakce rozdělí do tří směsí. Směs označená názvem „nízké izoformy“ obsahuje izoformy 4 až 12, směs označená názvem „střední izoformy“ obsahuje izoformy 5 až 15 a směs označená názvem „vysoké izoformy“ obsahuje izoformy 6 až 18.
- 40 5. Každá směs izoformem se individuálně purifikuje na sloupci pro HPLC s obrácenými fázemi C4 (Vydac). Sloupec se vyvíjí gradientem od 0,1% kyseliny trifluoroctové ve vodě do 0,1% kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu, přičemž zvyšování koncentrace acetonitrilu probíhá rychlostí 1 %/min.
- 45 6. Píková frakce analogu z každé směsi se shromáždí a zředí 4 objemy 80mM Tris-HCl/20mM Tris-báze a potom zkoncentruje. Provede se výměna pufru za 10 mM Tris o pH 7,2 za použití zařízení Centricon 3, která jsou odolná proti rozpouštědlům.
- 50 7. Každý vzorek se zředí na hodnotu 2 A₂₈₀/ml v 10mM Tris o pH 7,2 a přidá se stejný objem 4M hydrochloridu guanidinu (GuHCl, 10mM CHAMPS, 10mM Tris o pH 7,2 do koncentrace výsledného vzorku 1 A₂₈₀/ml). Každý vzorek se nanese na hydroxylapatitový minisloupec ekvilibrovaný 2M GuHCl, 5mM CHAPS, 10mM Tris o pH 7,2. Sloupec se promyje ekvilibračním pufrem a shromáždí se frakce o objemu jednoho sloupce.
- 55 8. Změří se absorbance frakcí, vyrobí se směsi a provede se výměna pufru za 10mM Tris o pH 7,2 za použití zařízení Centricon 10. Změří se absorbance každé směsi.

- Výsledné směsi se analyzují na SDS-PAGE a IEF gelech. IEF gely jsou znázorněny na obr. 12. Zkoušky RIA a zkoušky účinnosti in vivo se provádějí způsoby popsaným v příkladu 7A. Účinnost výsledných směsí izoform in vivo je uvedena v tabulce 8. Směsi izoform s vysokým obsahem kyseliny sialové se použije při experimentech zaměřených na zjištění zvýšení hematokritu u myši.

Tabulka 8

Účinnost izoform analogů erythropoietinu

Sekvence EPO	Směs izoform	Účinnost in vivo (U/mg peptidu) ^a
Thr ¹²⁵	izoformy 8 až 12	147 000 ^b
	izoformy 9 až 12	215 000 ^b
	izoformy 13 až 15	111 000 ^b
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	izoformy 7 až 12	132 000 ± 17 000
	izoformy 10 až 14	233 000 ± 39 000
	izoformy 12 až 12	272 000 ± 14 000

^a Množství erythropoietinového peptidu v mg se vypočítá z hodnoty A₂₈₀ směsí izoform Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO s použitím extinkčního koeficientu 0,93 pro 1 mg/ml roztoku.

^b Směrodatná odchylka u směsí izoform Thr¹²⁵EPO není uvedena, poněvadž stanovení účinnosti bylo prováděno jednou nebo dvakrát.

Příklad 8

Biologické vlastnosti analogu EPO N14

- Účinnost směsí izoform analogu EPO N14, rekombinantního humánního erythropoietinu (rHuEPO) a izolované izoformy rHuEPO 14 se srovnávají při i.v. farmakokinetických zkouškách, zkouškách vazby k receptoru a studiích hematokritu. Směsi izoform EPO N14 se vyrobí způsobem popsaným v příkladu 7C. rHuEPO se vyrobí způsobem popsaným ve výše uvedené publikaci Lei et al. Izoforma 14 rHuEPO se purifikuje následujícím způsobem: rHuEPO, který se skládá ze směsí izoform 10, 11, 12, 13, 14 a 15 se nanese na sloupec Q-Sepharose s rychlým průtokem (průměr 2,2 cm, výška 3,4 cm) ekvilibrovaný v 10mM Tris o pH 7,2. Sloupec s rHuEPO se ekvilibruje s 2mM kyselinou octovou/6mM močovinou (pufr A) a potom se provede eluce vícefázovým gradientem navrženým pro optimální purifikaci izoform 13 a 14. Gradient zahrnuje 0 až 7,3 % 800mM kyseliny octové/6M močoviny (pufr B) v 750 ml, 7,3 až 11,4 % pufru B v 750 ml, 11,4 až 26,8 pufru B ve 1 250 ml, 26,8 až 62,4 % pufru B ve 1 250 ml a potom 62,4 až 100 % pufru B v 700 ml. Sbírají se frakce o objemu 12,5 ml. Frakce se neutralizují hydroxidem amonným a zkouší izoelektrickou fokusací na polykrylamidových gelech. Frakce obsahující čistou izoformu 14 se spojí, zkoncentrují v míchané kyvetě Amicon vybavené membránou YM-10 a potom se provede výměna pufru za vodu.

A. i.v. farmakokinetické studie

Provedou se dvě oddělené studie pro srovnání farmakokinetických parametrů analogu EPO N14 (izoformy 15 až 17) a izolované izoformy 14 s rHuEPO.

- Při každé studii se 1 μCi buď ¹²⁵I-izolované izoformy 14, analogu ¹²⁵I-EPO N14, analogu ¹²⁵I-EPO N14, nebo ¹²⁵I-rekombinantního humánního erythropoietinu (Amersham) intravenosně vstříkne do kanyly zavedené do krční tepny samce krysy Sprague-Dawley o hmotnosti v rozmezí od 310 do 378 g. V různých dobách po podání se odebírají krevní vzorky o objemu 0,3 ml, které

- se centrifugací zpracují na sérum. Každý vzorek séra o objemu 0,1 ml se inkubuje přes noc při 4 °C z 90% ethanolem a potom se v něm stanoví koncentrace ^{125}I -EPO (buď rekombinantního humánního erythropoietinu, izolované izoformy 14, nebo analogu EPO N14). Ethanolem vysrážený ^{125}I -EPO v každém vzorku séra se spočítá v počítači gamma-rozpadů. Výsledné farmakokinetické křivky jsou uvedeny na obr. 13. Pro každou krysou se stanoví farmakokinetické parametry za použití nelineární regresní analýzy PCNONLIN 4.0 Statistical Consultants, 1992 a výsledky pro každou skupinu s zprůměrují. Výsledky farmakokinetických studií získané za použití analogu EPO N14 a izolované izoformy 14 jsou souhrnně uvedeny v tabulce 9.
- 10 Jak je zřejmé z tabulky 9, existuje podstatný rozdíl mezi hodnotou sérové clearance analogu EPO N14 a hodnotou vypočtenou pro rekombinantní humánní erythropoietin. Rekombinantní humánní erythropoietin vykazuje nejrychlejší beta poločas 3,10 hodiny ve srovnání s 3,97 hodiny pro izolovanou izoformu 14 a 4,36 hodiny pro analog EPO N14. Skupina s rekombinantním humánním erythropoietinem vykazuje také nejrychlejší poločas clearance 1,78 hodiny ve srovnání se
- 15 2,40 hodiny pro izolovanou izoformu 14 a 3,03 hodiny pro analog EPO N14.

T a b u l k a 9

Přehled farmakokinetických parametrů rHuEPO, isoformy 14 rHuEPO
a EPO N14 (isoformy 15 až 17) po i.v. podání

Přípravek	Poločas život- nosti (h)		AUC (cpm.h/ml) 0 - ∞ hodin	VD ml/kg	Rychlostní konstanta eliminace (h ⁻¹)	Clearance (ml/kg.h)	Poločas clearance (h)
	Alfa	Beta					
rHuEPO	střed	0,332	3,10	44,9	0,400	6,14	1,78
+ n=6	S.O.	0,155	0,54	8,3	0,069	1,36	0,27
Isoforma 14	střed	0,388	3,97	36,5	0,288	3,80	2,40
n=4	S.O.	0,066	0,40	2,2	0,020	0,12	0,15
EPO N14	střed	0,422	4,36	37,4	0,230	2,67	3,03
n=4	S.O.	0,165	0,36	1,9	0,021	0,17	0,27

+/ Průměrná hodnota pro skupiny, kterým byl podáván rekombinantní humánní erythropoietin při farmakokinetické studii s EPO N14 (n = 4, v případě skupiny, které byl podáván rekombinantní humánní erythropoietin) a při farmakokinetické studii s izolovanou isoformou 14 (n = 2, v případě skupiny, které byl podáván rekombinantní humánní erythropoietin).

S.O. = směrodatná odchylka

B. Stanovení vazby k receptoru

Interakce analogu EPO N14 (izoformy 15 až 17) s receptorem erythropoietinu se studují vytěšňovací zkouškou za chladu za použití erythroleukemických buněk OCIM1 (Papayannopoulou et al., Blood 64 (supp. 1), 116a (1984)). Zvyšující se koncentrace neznačeného EPO N14 se inkubují s buňkami OCIM1 spolu s konstantní koncentrací ^{125}I -rHuEPO, za účelem stanovení množství EPO N14 potřebného pro soutěž s ^{125}I rHuEPO o vazbu k receptoru. Pro srovnání se nechá s konstantní koncentrací ^{125}I -rHuEPO soutěžit také postupně se zvyšující koncentrace neznačeného rHuEPO.

Neznačený EPO N14 se zředí zkouškovým pufrům a přidá se množství 0,03 ng, 0,1 ng, 0,3 ng, 1,0 ng, 3,0 ng, 10,0 ng a 30,0 ng (vztaženo na hmotnost peptidu). Do všech zkumavek se přidá 0,5 ng ^{125}I -rekombinantního humánního EPO a potom se přidá vždy přibližně $0,5 \times 10^6$ buněk OCIM1. Zkumavky se inkubují při 37 °C ve třepané vodní lázni po dobu 2 hodiny. Po inkubaci se roztoky odstředí přes dibutylftalátový/bifthalátový olejový roztok, aby se oddělil nenavázaný ^{125}I -rHuEPO od ^{125}I -rHuEPO vázaného k buňkám OCIM1. Izolují se buněčné pelety a množství ^{125}I -rHuEPO vázaného k buňkám se stanoví spočítáním gamma-rozpad. Vypočítá se údaj charakterizující specifickou vazbu k buňkám a lineární regresní analýzou se stanoví koncentrace neznačeného proteinu, které je zapotřebí pro to, aby bylo 50 % ^{125}I -rHuEPO vázaného za nepřítomnosti kompetitoru vyřazeno ze soutěže.

Z výsledků tří zkoušek vyplývá, že v průběhu je zapotřebí $2,67 \pm 0,73$ ng neznačeného peptidu EPO N14 pro snížení vazby ^{125}I -rHuEPO k buňkám OCIM1 o 50 %. Při stejných třech zkouškách je zapotřebí v průměru $0,51 \pm 0,15$ ng neznačeného rHuEPO pro soutěž s vazbou 0,5 ng ^{125}I -rHuEPO. Na základě těchto výsledků je zapotřebí 5,25-násobného nadbytku EPO N14 pro soutěž s vazbou ^{125}I -rHuEPO k receptoru EPO ve srovnání s neznačeným rHuEPO ($p < 0,01$).

Také se provede přídatná experiment přímého srovnání vazby analogu EPO N14, izolované izoformy 14 a rekombinantního erythropoietinu k receptoru erythropoietinu. Výsledky tohoto experimentu ukazují, že analog EPO N14 má k receptoru nižší afinitu než izolovaná izoforma 14. Ve srovnání s neznačenou izoformou 14 je při soutěži s ^{125}I -rHuEPO o vazbu k receptoru zapotřebí přibližně dvojnásobného nadbytku analogu EPO N14 (obr. 14).

C. Studie hematokritu

Provede se in vivo studie pro srovnání schopnosti vysokých a nízkých izoform EPO N14 (z preparativního postupu 2 popsaného v příkladu 7C), izolované izoformy 14 a rekombinantního humánního EPO zvýšit hematokrit ošetřených myší. Rozdělení izoform ve směsích izoform EPO N14 označených názvy „vysoké izoformy“ a „nízké izoformy“, které se používá při této studii, je uvedeno na obr. 12.

Myšim CD1 (o hmotnosti asi 30 g) se po dobu celkem 6 týdnů 3 x za týden intraperitoneálně injikuje jeden z výše uvedených přípravků v 0,25% myším sérovém albuminu nebo placebo (PBS s 0,25% myším sérovým albuminem). Dávkování erythropoietinových přípravků je vztaženo na hmotnost peptidu a je upraveno tak, aby 30g myš obdržela 0,071 µg peptidu/dávka, a to buď vysokých frakcí EPO N14, nízkých frakcí EPO N14, izoformy 14, nebo standardního rHuEPO. Při zkoušení vysokých frakcí EPO N14 a izoformy N14 se použije též přídatné skupiny, které se podává 0,036 µg peptidu/dávka. Hematokrity všech myší se stanoví před zahájením pokusu a potom se zjišťují dvakrát týdně retroorbitálním odběrem krve. Na závěr pokusu se shromáždí sérum všech zvířat a zkouší se na protilátky proti vstříknutému produktu. Dat získaných u zvířat, která jsou charakterizována jako negativní s ohledem na neutralizaci protilátek, se použije při následné analýze.

Jak ukazuje obr. 15, zvířata, kterým byly podány vysoké izoformy EPO N14, vykazují nejvyšší průměrnou hodnotu hematokritu ve skupině ve srovnání se zvířaty kterým bylo podány ostatní přípravky. Izoforma 14, rekombinantního humánního EPO a nízké izoformy EPO N14 zvyšují hematokrit v menším rozsahu.

5

10 Za účelem porovnání různých erythropoietinových přípravků kvantitativnějším způsobem se vypočítá průměrná počáteční rychlost vzrůstu hematokritu (0 až 11 dnů), změří se plocha pod křivkou (0 až 39 dnů) a vypočítá se celkové zvýšení hematokritu (tabulka 10). Ať již se použije kteréhokoliv z těchto kritérií, zdá se být směs „vysoké izoformy“ EPO N14 účinnější (vztaženo na hmotnost peptidu) než kterýkoliv z ostatních zkoušených přípravků. Jak směs „vysoké izoformy“ EPO N14, tak izoforma 14 je účinnější než rekombinantní humánní EPO. Směs „nízké izoformy“ EPO N14 vykazuje nejnižší účinnost při srovnávání za použití kterékoliv z těchto analýz.

T a b u l k a 10

Účinek EPO N14 (směsi "vysoké isoformy" a "nízké isoformy") isoformy 14
a rHuEPO na hematokrit myší

Přípravek	Dávka (μg)	Rychlost zvyšování hematokritu ¹ (body/den)	Plocha pod křivkou ²	Celkové zvýše- ní hematokritu ³ (body)
Vysoké iso- formy N14	0,071	1,46	619	25,4
Isoforma 14	0,071	1,19	546	22,6
Vysoké iso- formy N14	0,036	0,98	428	19,1
Isoforma 14	0,036	0,76	284	10,7
rHuEPO	0,071	1,0	424	17,5
Nízké iso- formy N14	0,071	0,5	212	9,3

¹Počáteční rychlost zvyšování hematokritu se vypočítá metodou lineární regrese z výsledků od dne 0 do dne 11.

²Plocha pod křivkou se vypočítá trapezoidní sumací z výsledků od dne 0 do dne 39.

³Celkové zvýšení hematokritu se vypočítá jako rozdíl průměrné hodnoty hematokritu u skupiny v den 39 a průměrné hodnoty hematokritu u skupiny při zahájení pokusu.

Vynález byl sice popsán za použití přednostních provedení, odborníkům v tomto oboru je však zřejmé, že jej lze různým způsobem obměňovat a modifikovat, přičemž všechny takové variace spadají do rozsahu tohoto vynálezu, pokud jsou kryty následujícími patentovými nároky. Tyto patentové nároky je třeba vykládat na podkladě ekvivalentů.

SEZNAM SEKVENCÍ

10

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) PŘIHLAŠOVATEL: Elliott, Steven G.
Byrne, Thomas E.

15

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Analogy erythropoietinu

(iii) POČET SEKVENCÍ: 26

20

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

(A) ADRESÁT: Amgen Inc., U.S. Patent
Operations/rbw

(B) ULICE: 1840 DeHavilland Drive

25

(C) MĚSTO: Thousand Oaks

(D) STÁT: Kalifornie

(E) ZEMĚ: USA

(F) PSČ: 91320-1789 (ZIP)

30

(v) STROJNĚ ČITELNÁ FORMA:

(A) TYP MEDIA: Disketa

(B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní

(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS

35

(D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, verze #1.25

(vi) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K TÉTO PŘIHLÁŠCE:

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: US 08/108, 016

40

(B) DATUM PODÁNÍ: 17. srpna 1993

(C) ZATŘÍDĚNÍ:

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 1:

45

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 30 bázevých párů

(B) TYP: nukleová kyselina

50

(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 1:

CGCCCACCAA ACCTCAGCTG TGACAGCCGA

30

5

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

- (A) DÉLKA: 27 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

15

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 2:

20

ATCTGTACAA CCGAAGCCTG GAGAGGT

27

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 3:

25

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

30

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 3:

35

GGGCCTGGCC AACCTGTCGG AAG

23

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 4:

40

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 26 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

45

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

50

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 4:

TCCCCTCCAG ATAATGCCTC AGCTGC

26

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 24 báзовých párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 5:

CAGATGCGAA CTCATCTGCT CCAG

24

15

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 20 (A) DÉLKA: 33 báзовých párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

25

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 6:

AGGCCTGCAG GAATGGGAGC AGATGACCAG GTG

33

30

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 35 (A) DÉLKA: 23 báзовých párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

40

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 7:

TCCAGATGCG ACCTCAGCTG CTC

23

45

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 50 (A) DÉLKA: 23 báзовých párů
 (B) TYP: nukleová kyselina

55

(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 8:

CCTCCAGATC CGACCTCAGC TGC

23

10

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

15

(A) DÉLKA: 28 bázových párů
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
(D) TOPOLOGIE: lineární

20

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 9:

GGGCCTGGCC AACCTGACAG AAGCTGTC

28

25

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

30

(A) DÉLKA: 30 bázových párů
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
(D) TOPOLOGIE: lineární

35

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 10:

40

CAGGGCCTGT CCAACCTGAC AGAAGCTGTC

30

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 11:

45

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 24 bázových párů
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
(D) TOPOLOGIE: lineární

50

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 11:

CAGATGCGAA CTCAACGGCT CCAC

24

5

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

- (A) DÉLKA: 35 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

15

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 12:

ATGCGAACTC AACGGCTCCA CTCACAACAA TCACT

35

20

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

25

- (A) DÉLKA: 27 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

30

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 13:

CCAGATCCAA ATTCATCTGC TCCACTC

27

35

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 14:

40

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 27 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

45

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 14:

CCAGATCCAA ATTCAACAGC TCCACTC

27

50

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 24 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 15:

15 CCAGATGCGA CAACAGCTGC TCCA 24

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 20 (A) DÉLKA: 23 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

25 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 16:

30 AGATCCGACC ACCGCTGCTC CAC 23

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 35 (A) DÉLKA: 23 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

40 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 17:

45 TGCTCCACTC ACAACAATCA CTG 23

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 50 (A) DÉLKA: 184 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina

55

(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 18:

```
TCGAGGAACT GAAAAACCAG AAAGTTAACT GGTAAGTTTA GTCTTTTGT CTTTATTTT 60
AGGTCCCGGA TCCGGTGGTG GTGCAAATCA AAGAACTGCT CCTCAGTGGG TGTTCCTTT 120
ACTTCTAGGC CTGTACGGAA GTGTTACTTC TGCTCTAAAA GCTGCTGCAA CAAGCTGGTC 180
GACC 184
```

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 19:

10 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 107 bázových párů
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
15 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 19:

```
CCTGTAGGAC AGGGGACAGA TCCTCTTCCT CAAAGGCCCC TCCCCCAGC CTTCCAAGTC 60
CATCCCGACT CCCGGGGGCC TCGGACACCC CGATCCTCCC ACAATGA 107
```

20

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

25 (A) DÉLKA: 108 bázových párů
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
(D) TOPOLOGIE: lineární

30 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 20:

```
GATCTCATTG TGGGAGGATC GGGGTGTCCG AGGGCCCCGG GAGTCGGGAT GGACTTGGAA 60
GGCTGGGGGG AGGGGCCGAG GAAGAGGATC TGTCCCTGT CCTACAGG 108
```

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 23 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 21:

15 GGAGGCCGAG CAGATCACGA CGG 23

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 20 (A) DÉLKA: 23 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

25 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 22:

30 CTTGAATGAG CAGATCACTG TCC 23

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 35 (A) DÉLKA: 21 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

40 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 23:

45 CTGTTGGTCC AGTCTTCCCA G 21

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 50 (A) DÉLKA: 23 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina

55

(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 24:

CCTGTTGGTC CAGTCTTCCC AGC

23

10

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

15

(A) DÉLKA: 28 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec

(D) TOPOLOGIE: lineární

20

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 25:

Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg
1				5					10					15	

Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln
			20					25			

25

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

30

(A) DÉLKA: 193 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec

(D) TOPOLOGIE: lineární

35

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 26:

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

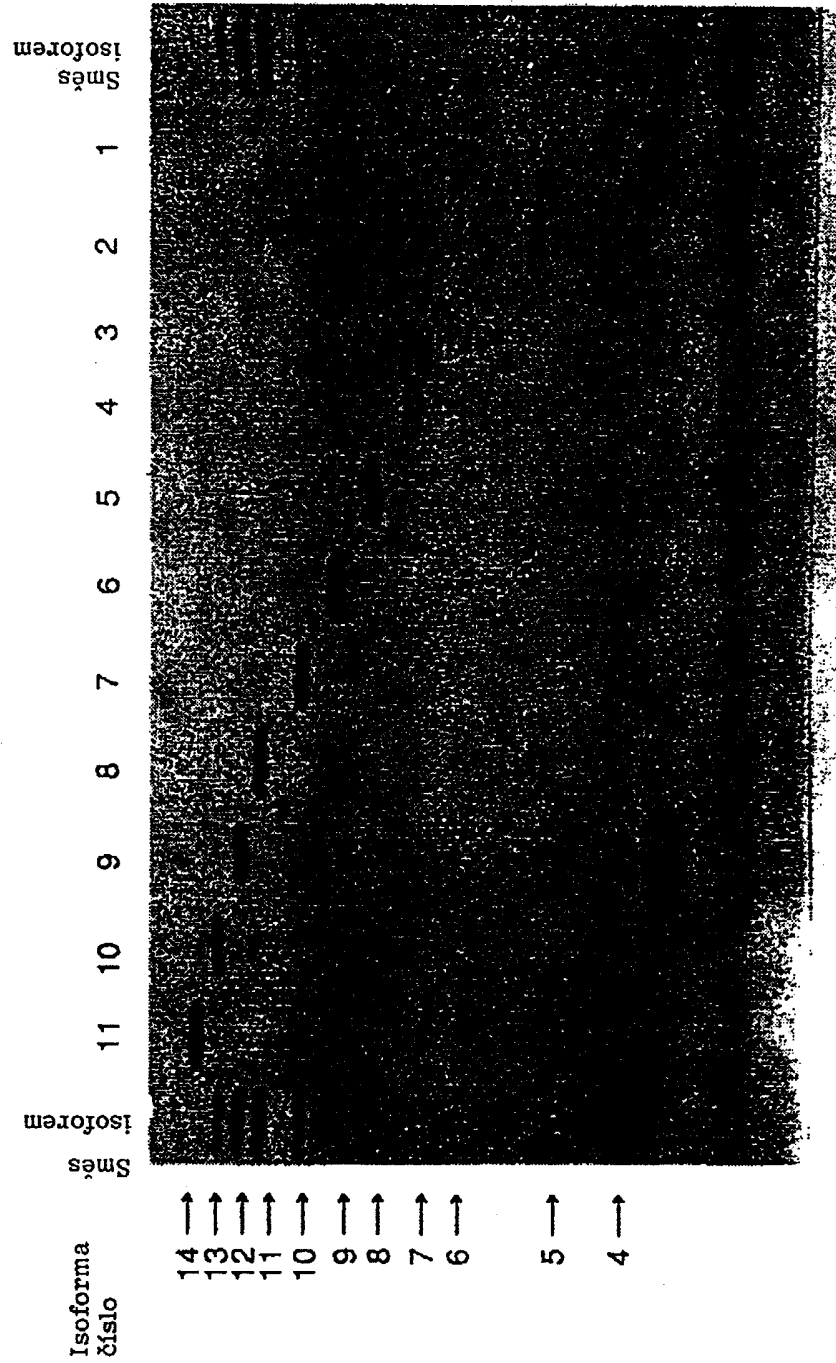
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Analog humánního erythropoietinu, zahrnující adici jedné nebo více aminokyselin ke karboxylovému konci erythropoietinu, přičemž v adovaných aminokyselinách je obsaženo alespoň jedno místo pro glykosylaci.
- 10 2. Analog humánního erythropoietinu podle nároku 1 zahrnující adici peptidového fragmentu získaného z karboxyterminální části humánního chorionického gonadotropinu, přičemž tento fragment je připojen ke karboxylovému konci erythropoietinu.
- 15 3. Analog humánního erythropoietinu podle nároku 2 zvolený ze souboru sestávajícího z
- a) humánního erythropoietinu, k jehož karboxylovému konci je připojena aminokyselinová sekvence Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln;
- 20 b) analogu charakterizovaného v odstavci a), který dále obsahuje Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO; a
- c) analogu charakterizovaného v odstavci a), který dále obsahuje Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰-EPO.
- 25 4. Sekvence DNA kódující analog humánního erythropoietinu podle nároku 1.
5. Sekvence DNA kódující analog humánního erythropoietinu podle nároku 3.
6. Eukaryontní hostitelská buňka transfekovaná sekvencí DNA podle nároku 4 způsobem umožňujícím hostitelské buňce exprimovat analog humánního erythropoietinu.
- 30 7. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství analogu erythropoietinu podle některého z nároků 1 až 3 spolu s farmaceuticky vhodným ředidlem, adjuvancem nebo nosičem.
- 35 8. Použití terapeuticky účinného množství analogu erythropoietinu podle některého z nároků 1 až 4 pro výrobu farmaceutického prostředku pro zvyšování hematokritu u pacienta.

40

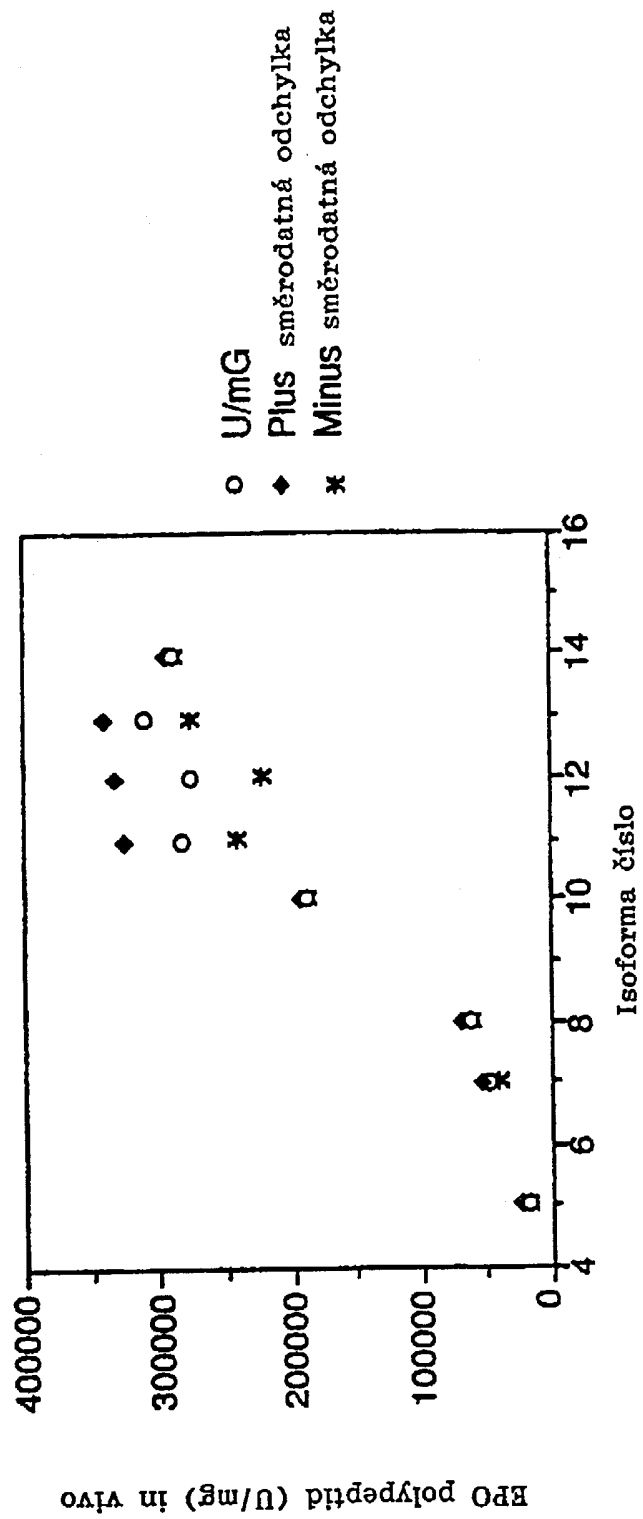
19 výkresů

Obr. 1

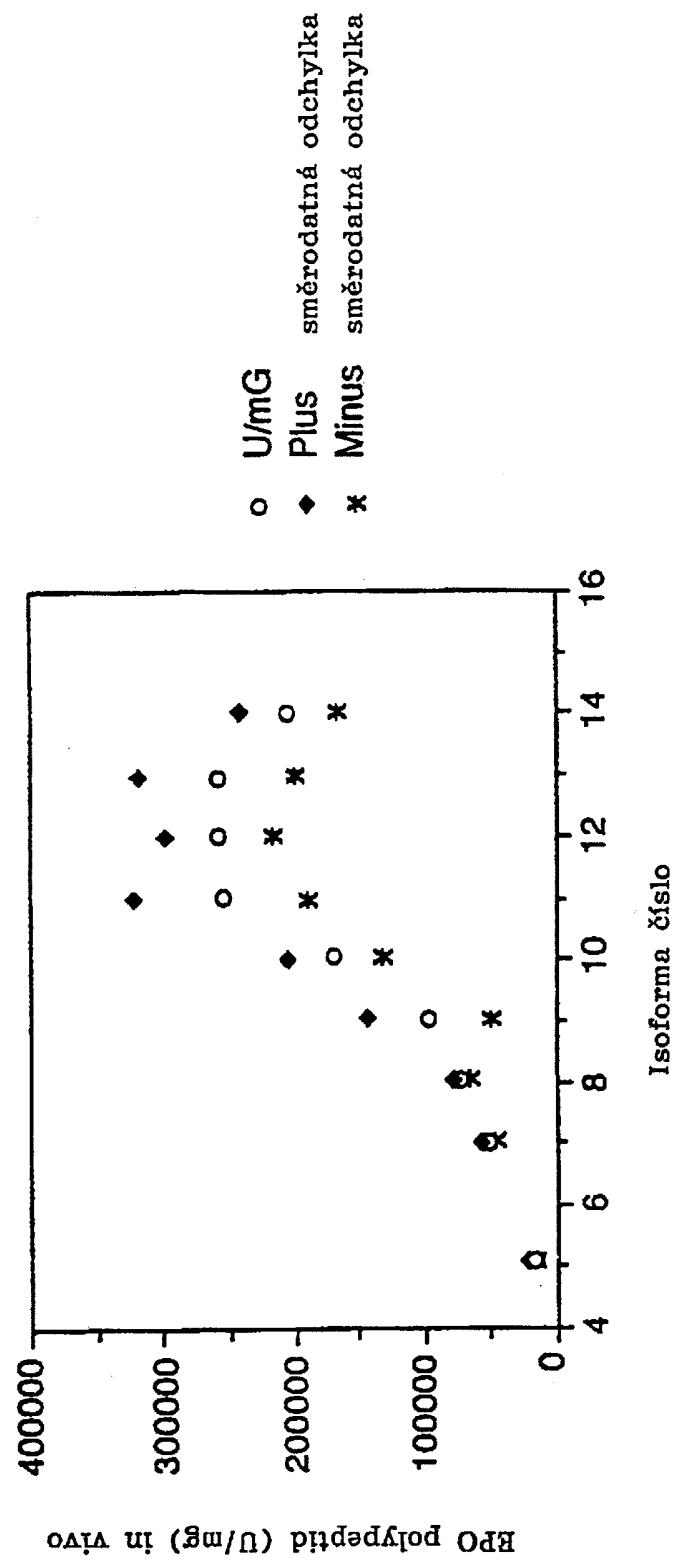


Obr. 2A

Bradfordova analýza proteinu

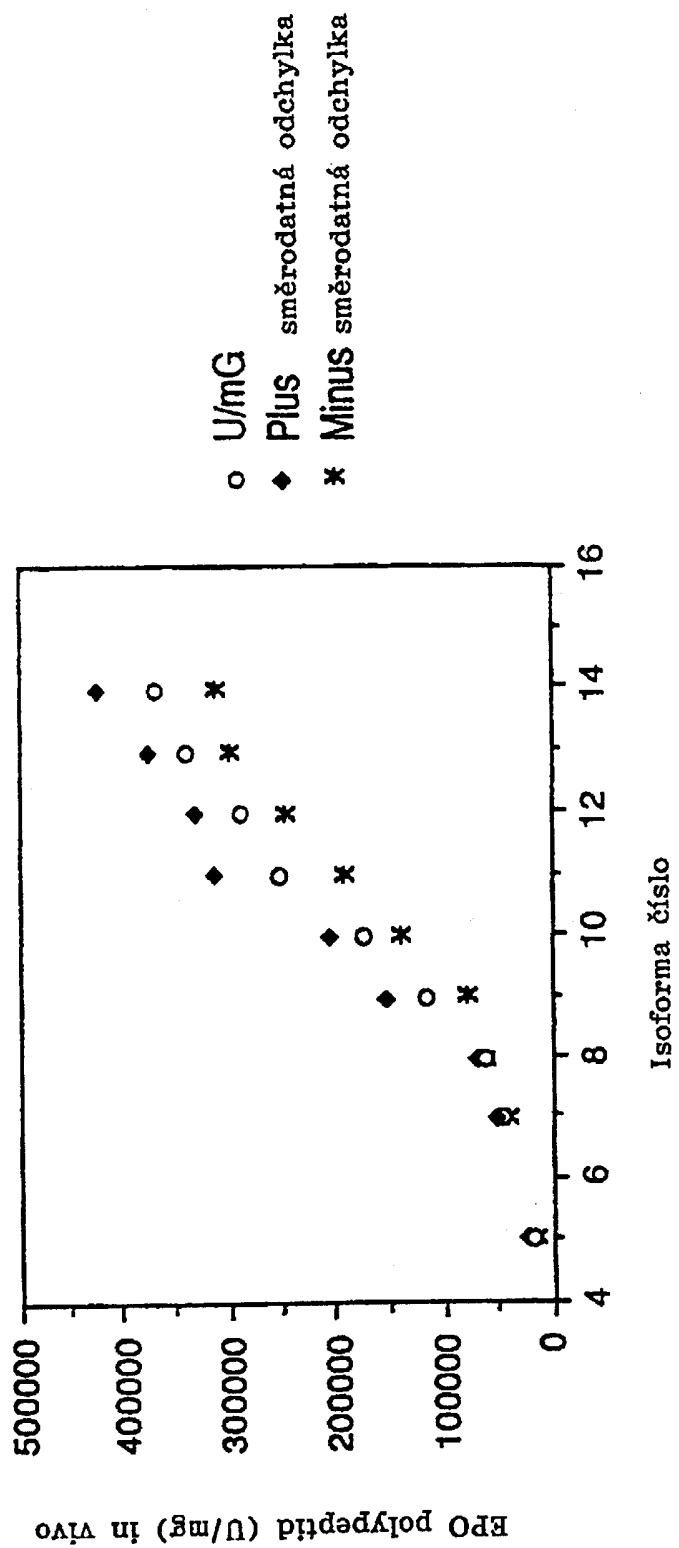


Obr. 2B

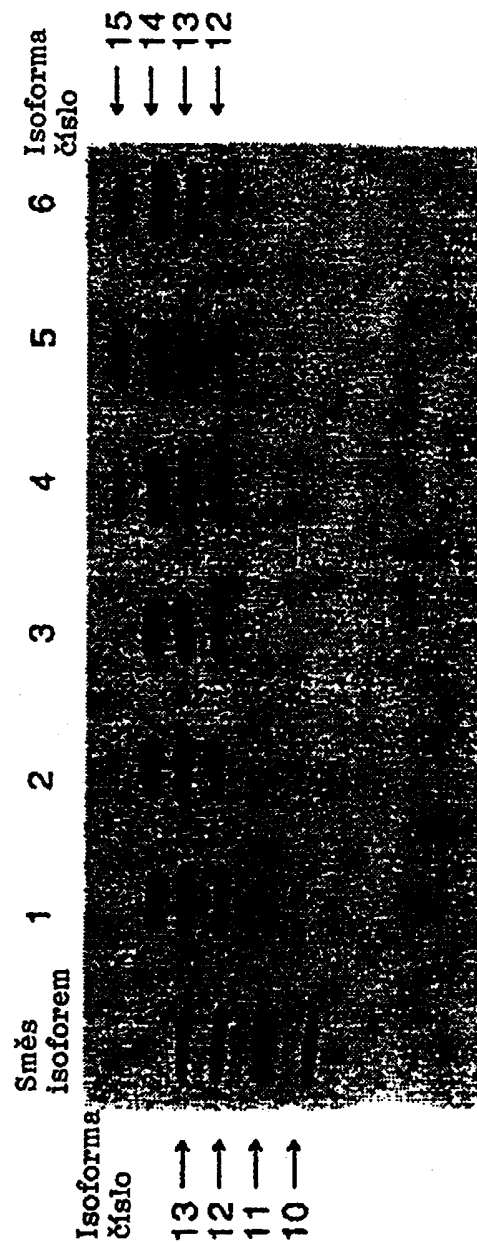
Analýza na základě A_{280} 

Obr. 2C

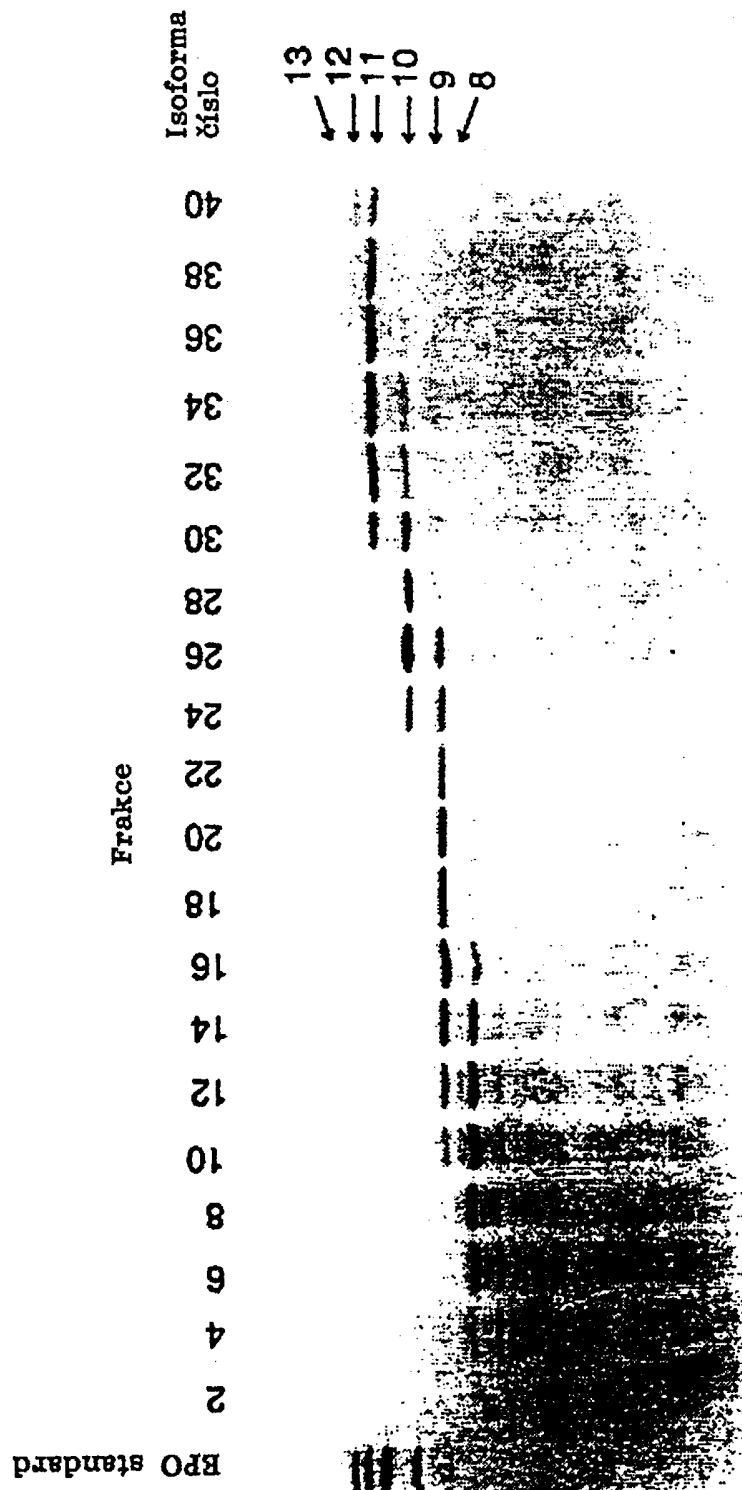
Analýza na základě RIA



Obr. 3



Obr. 4



-27 +1 10 20 □

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT

↓ ↓ ↓ ↓
N S N S
□ □

30 □40 50 60 70

TGCAEHCSLNENTVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLRGQA

↓
N
□

80 □ 90 100 110 120 * 130

LLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRT

*
↑
NN S
□□

140 150 160

ITADTFRKLFrvYSNFLRGKLkLYTGACRTGDR

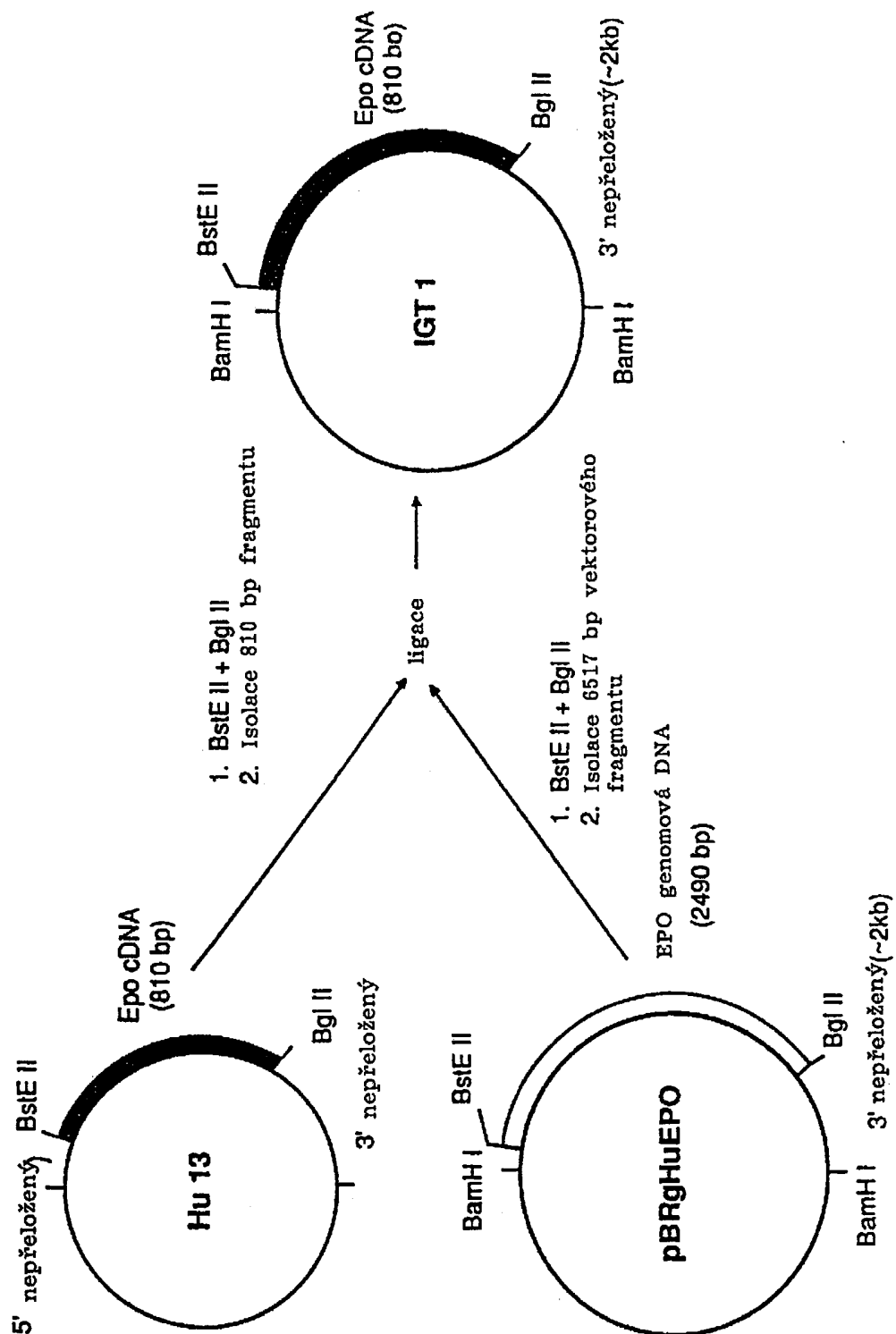
↓ ↓
N S
□

□ = místo pro N-glykosylaci

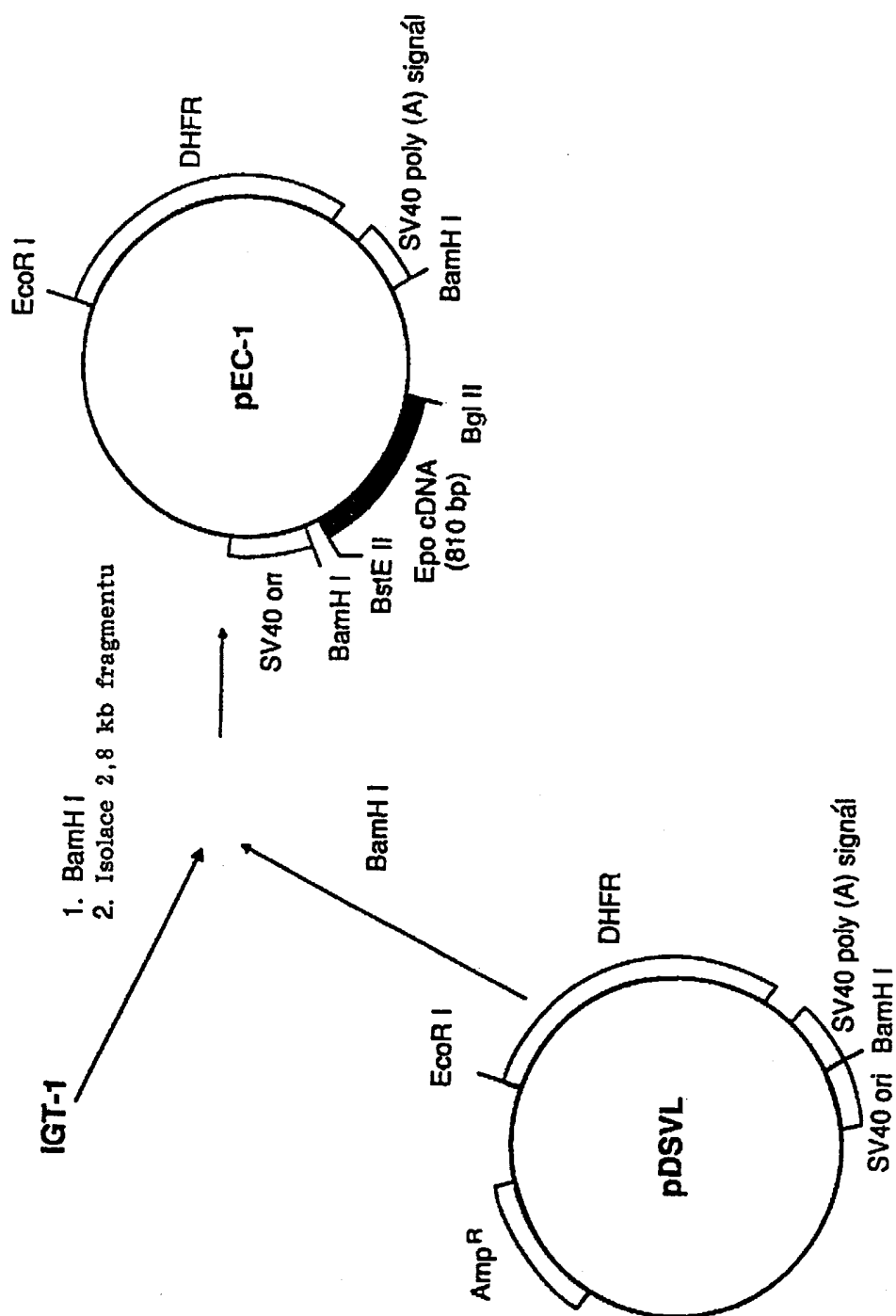
* = místo pro O-glykosylaci

Obsah

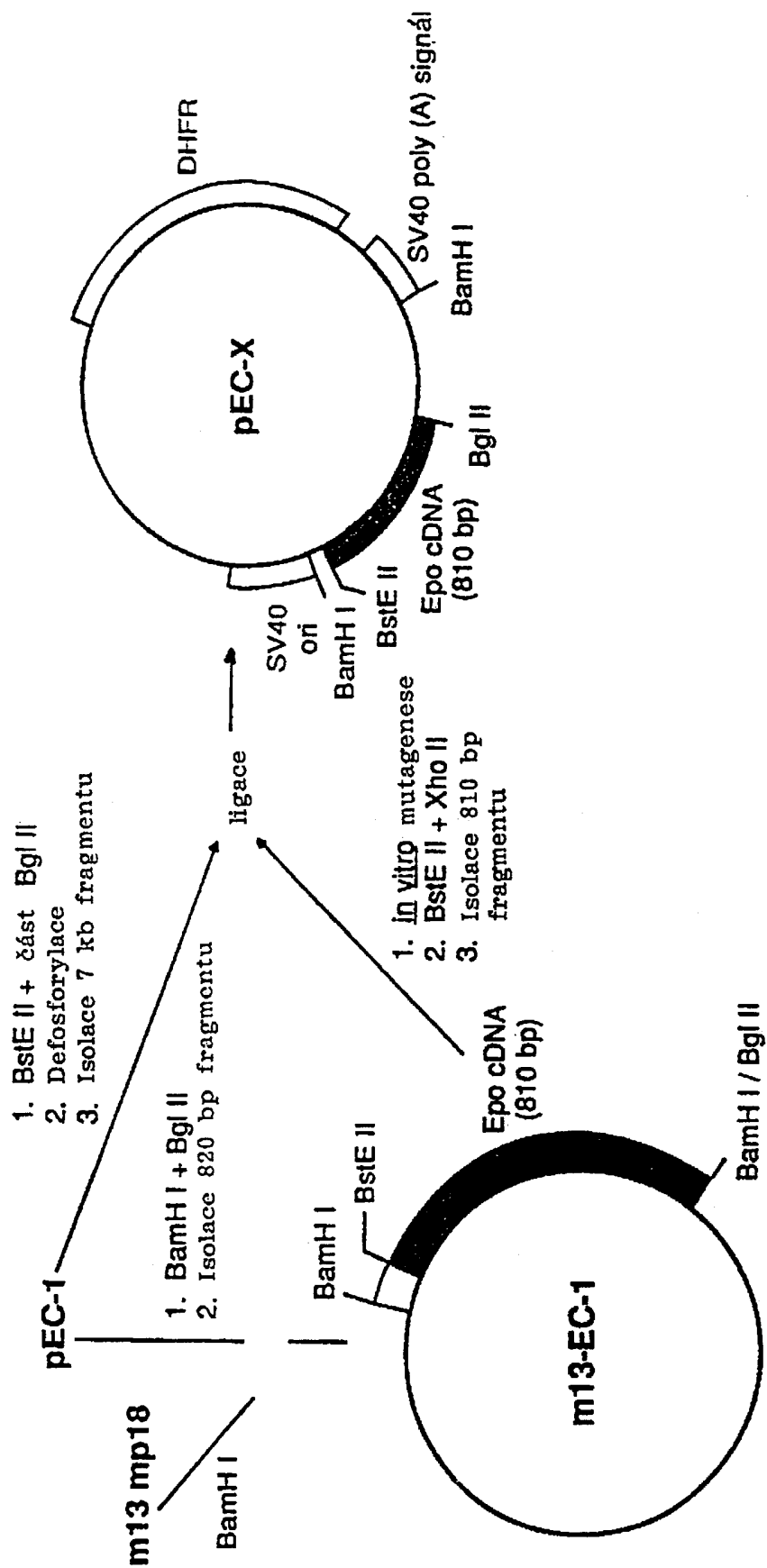
Obr. 6A



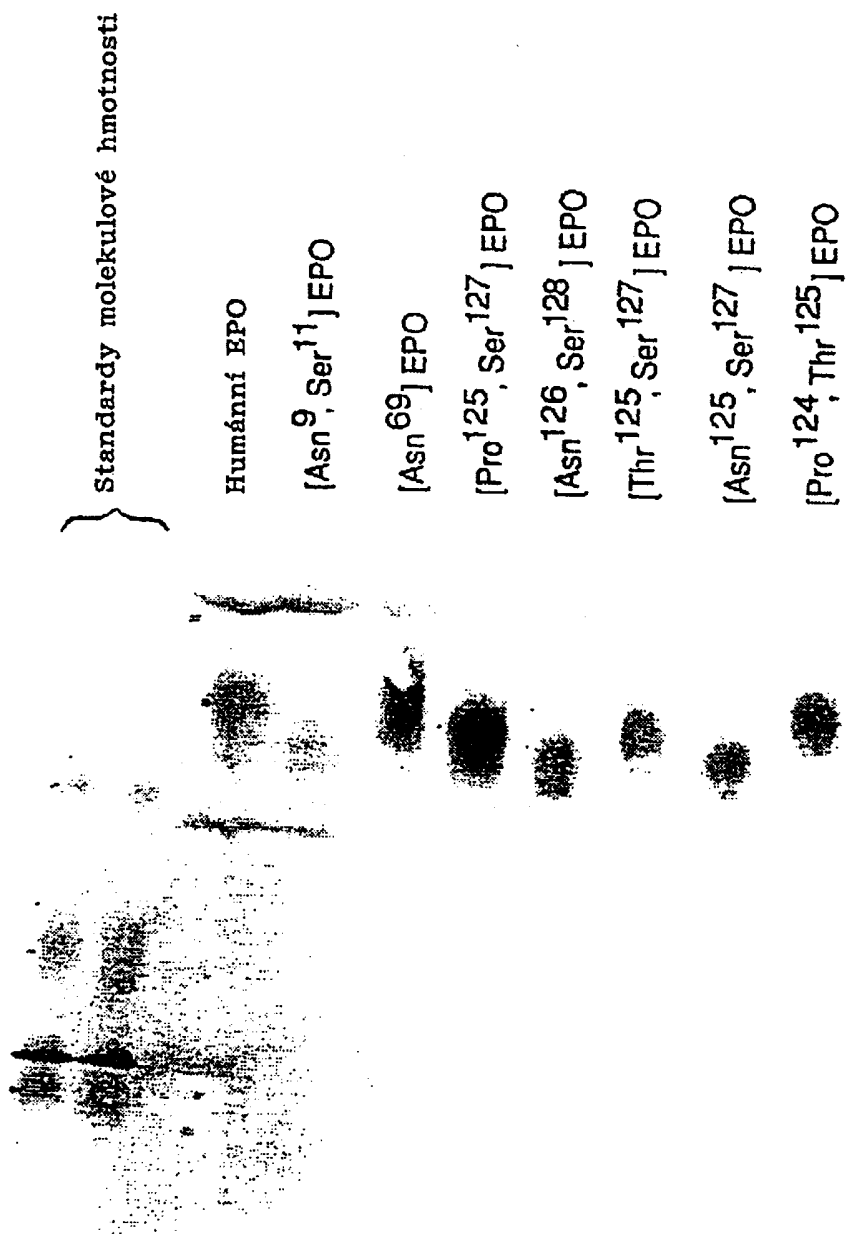
Obr. 6B



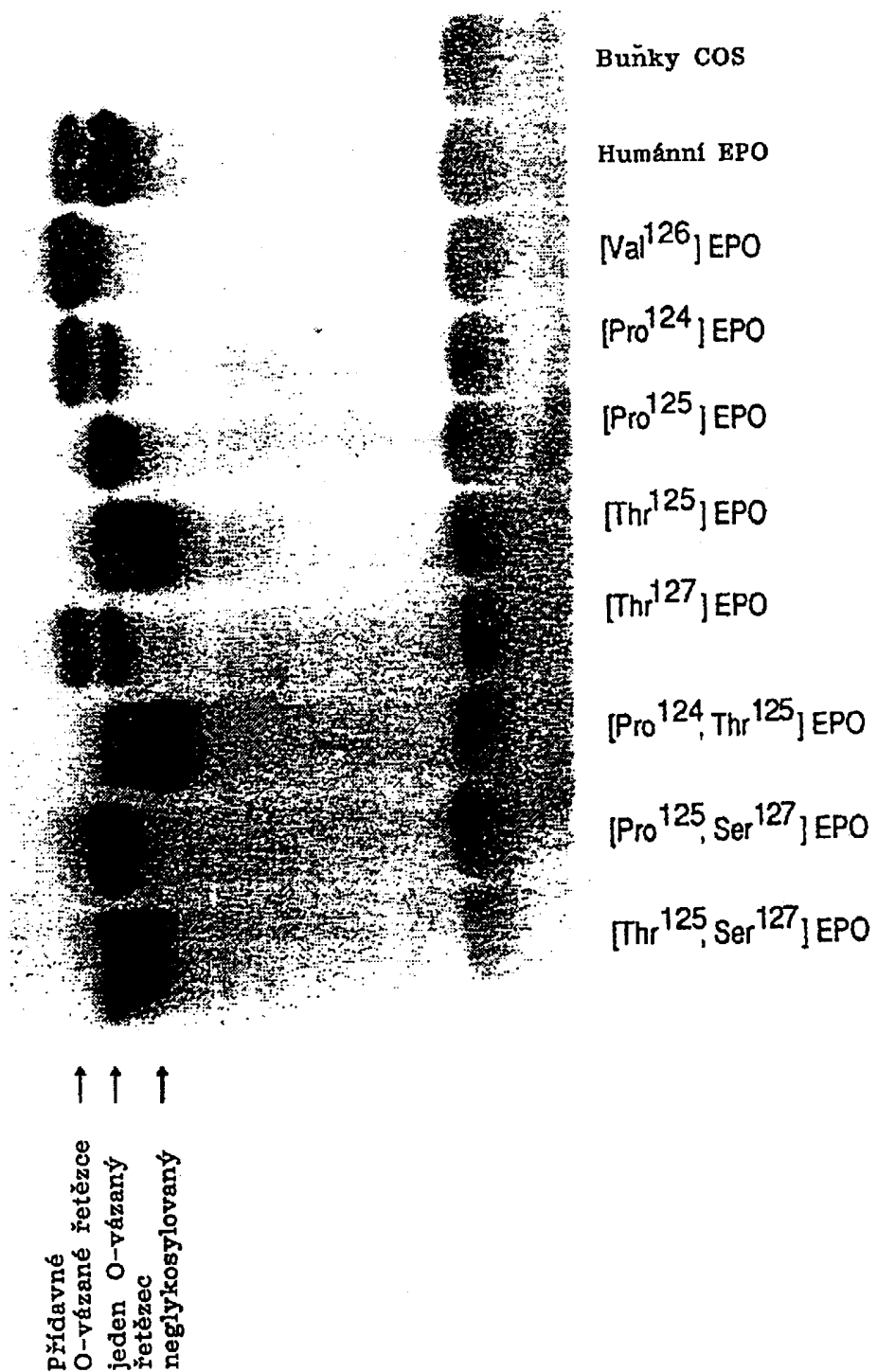
Obr. 6C



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

EPO STANDARD

Směs 4

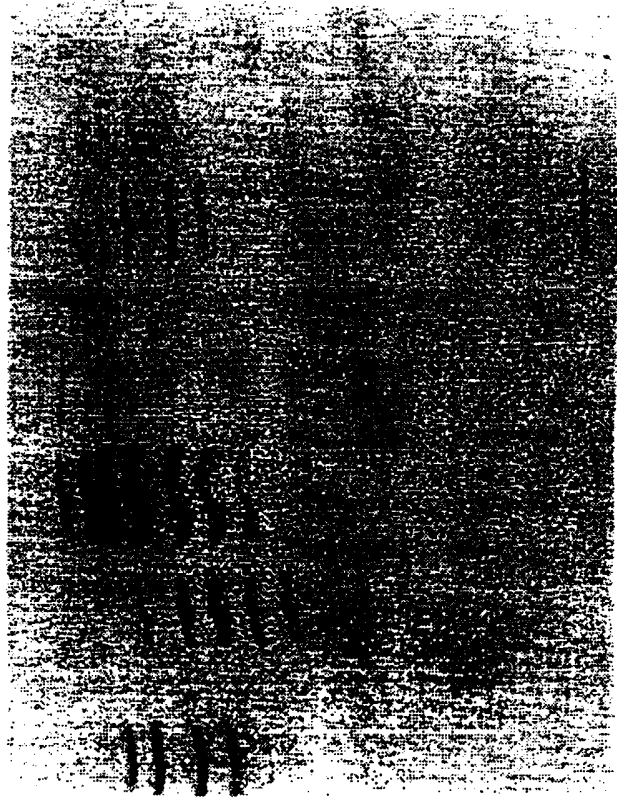
Směs 3

Směs 2

EPO STANDARD

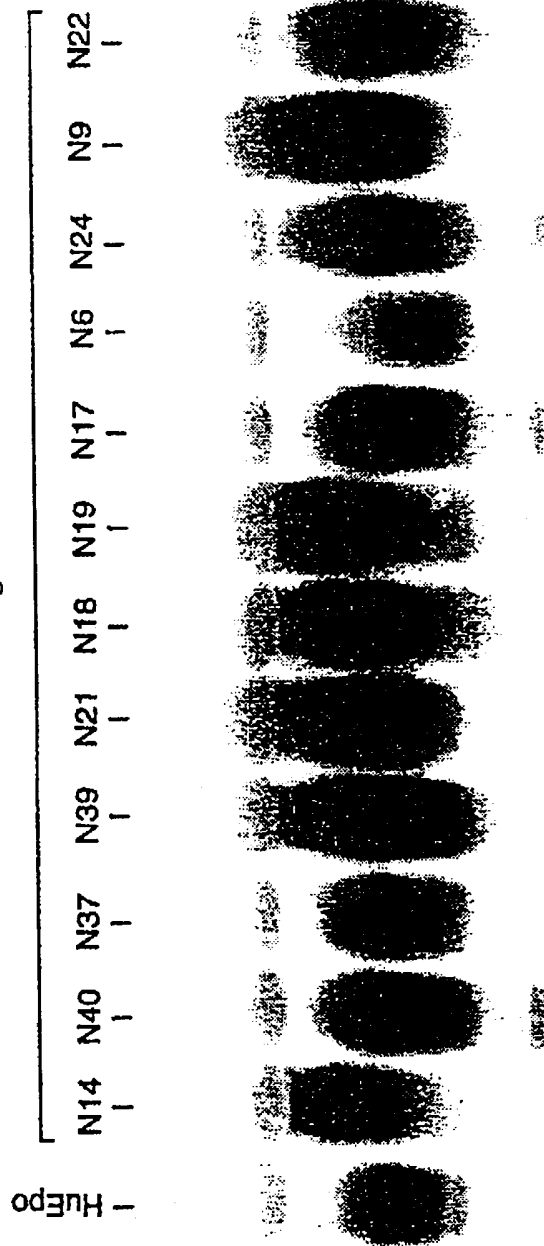
Isoforma
číslo

15 ↑
14 ↑
13 ↑
12 ↑
11 ↑
10 ↑

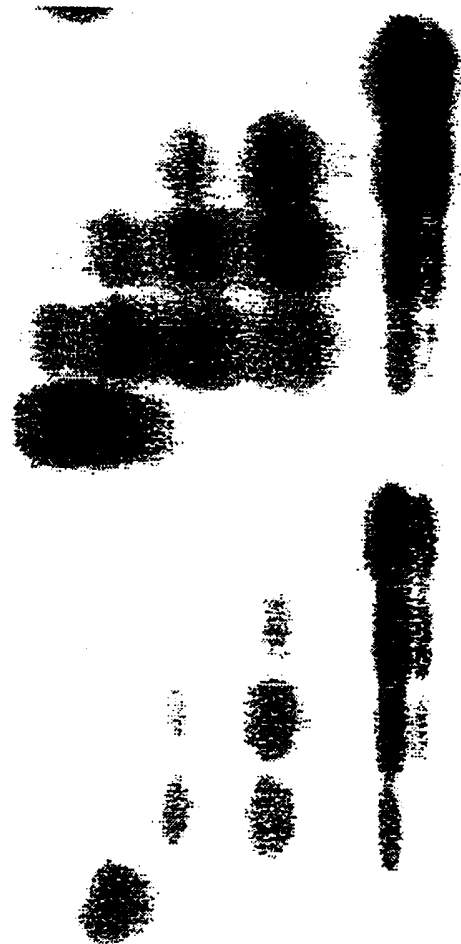
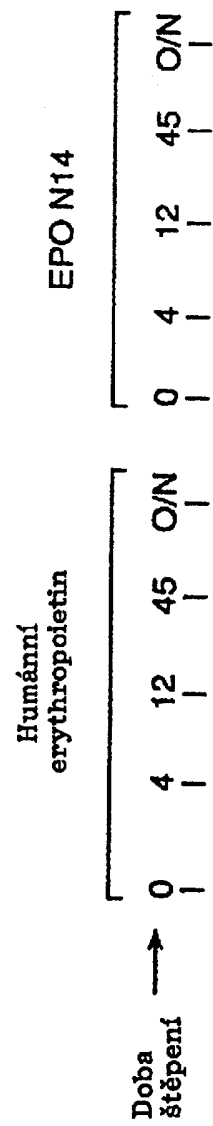


Obr. 10

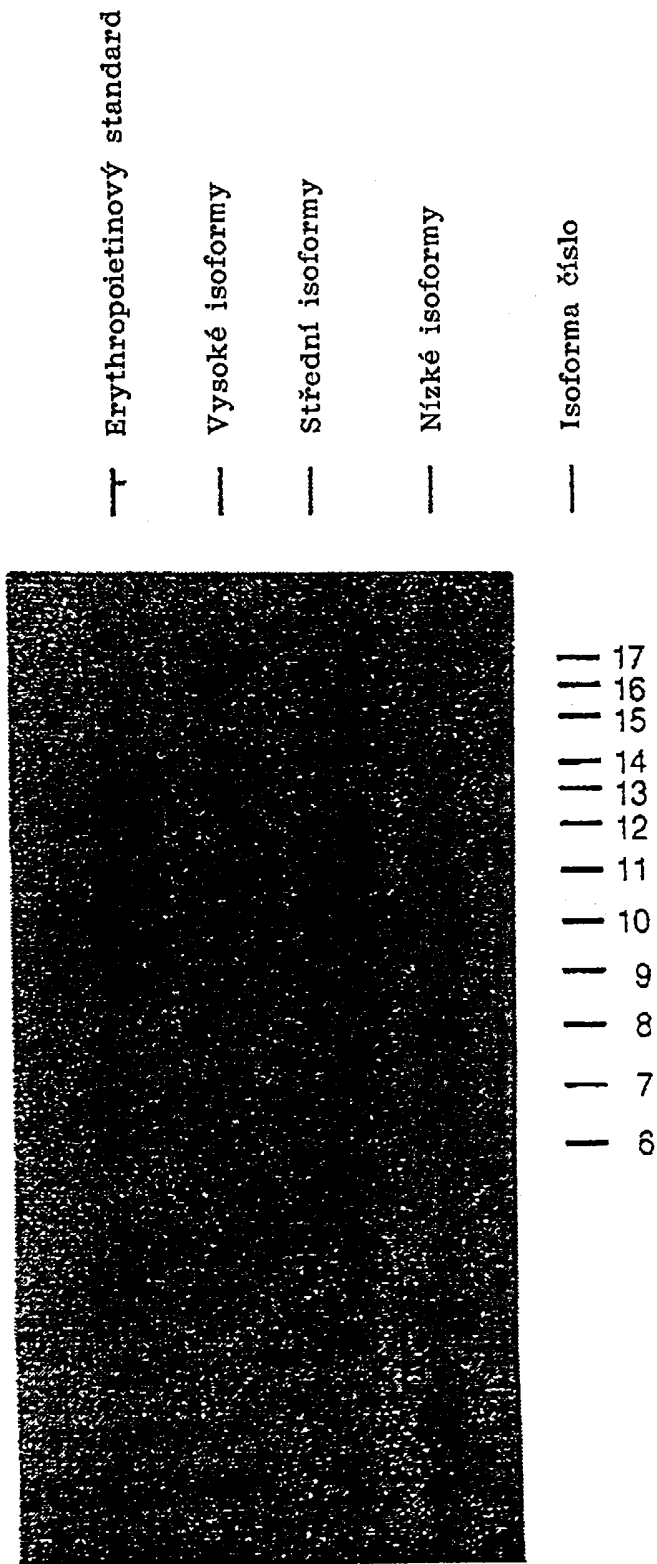
Analog číslo



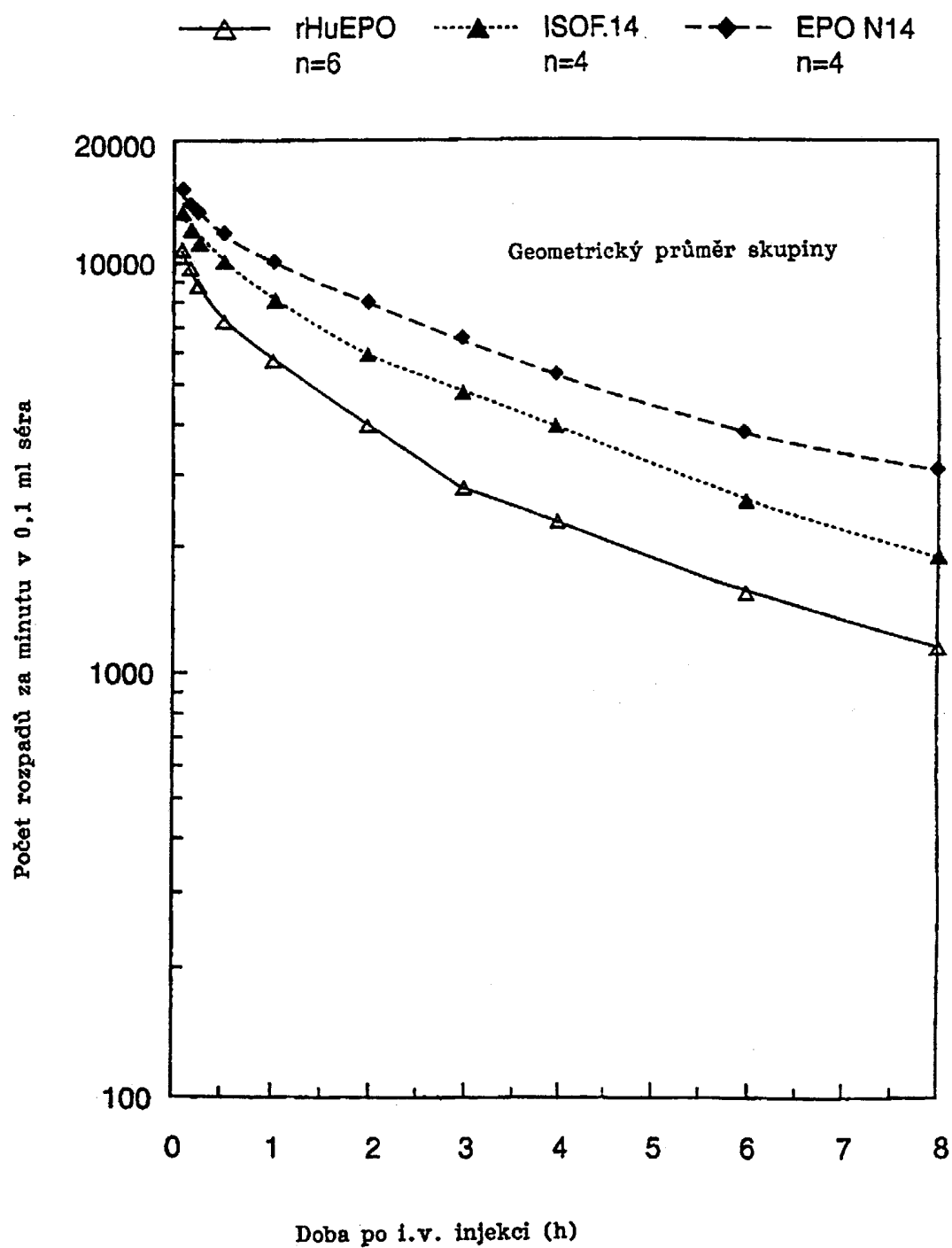
Obr. 11



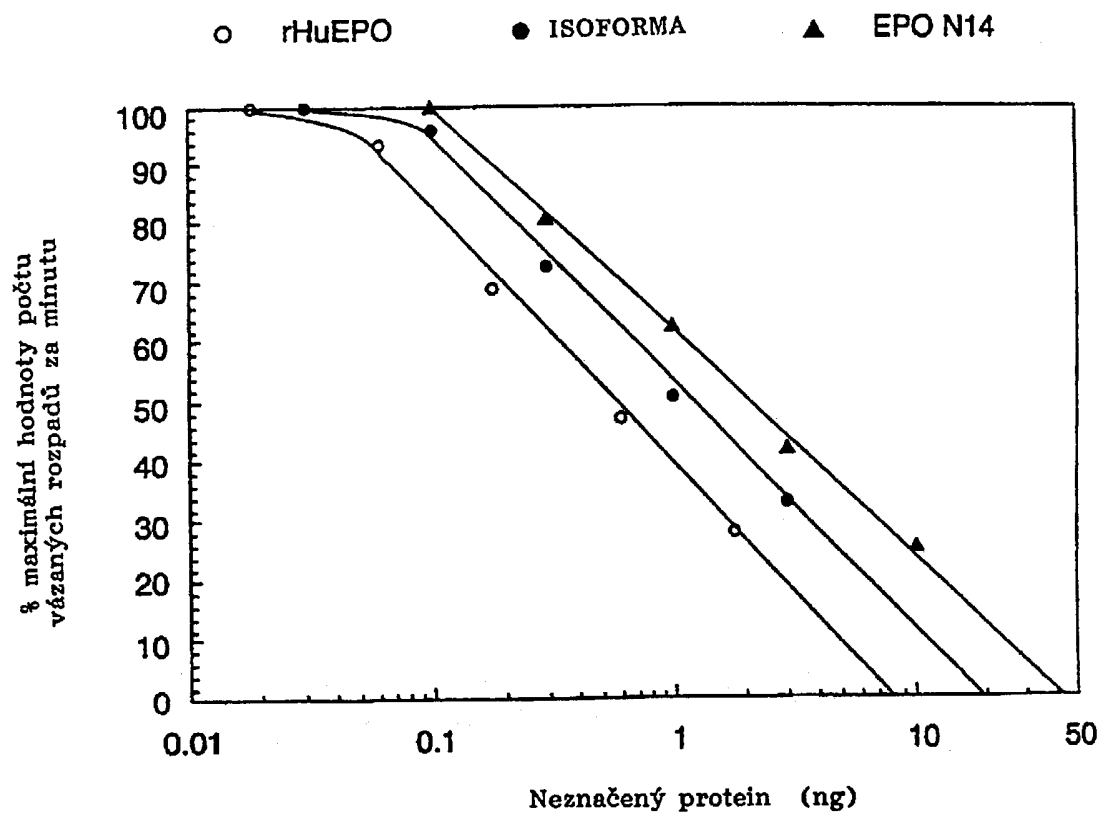
Obr. 12



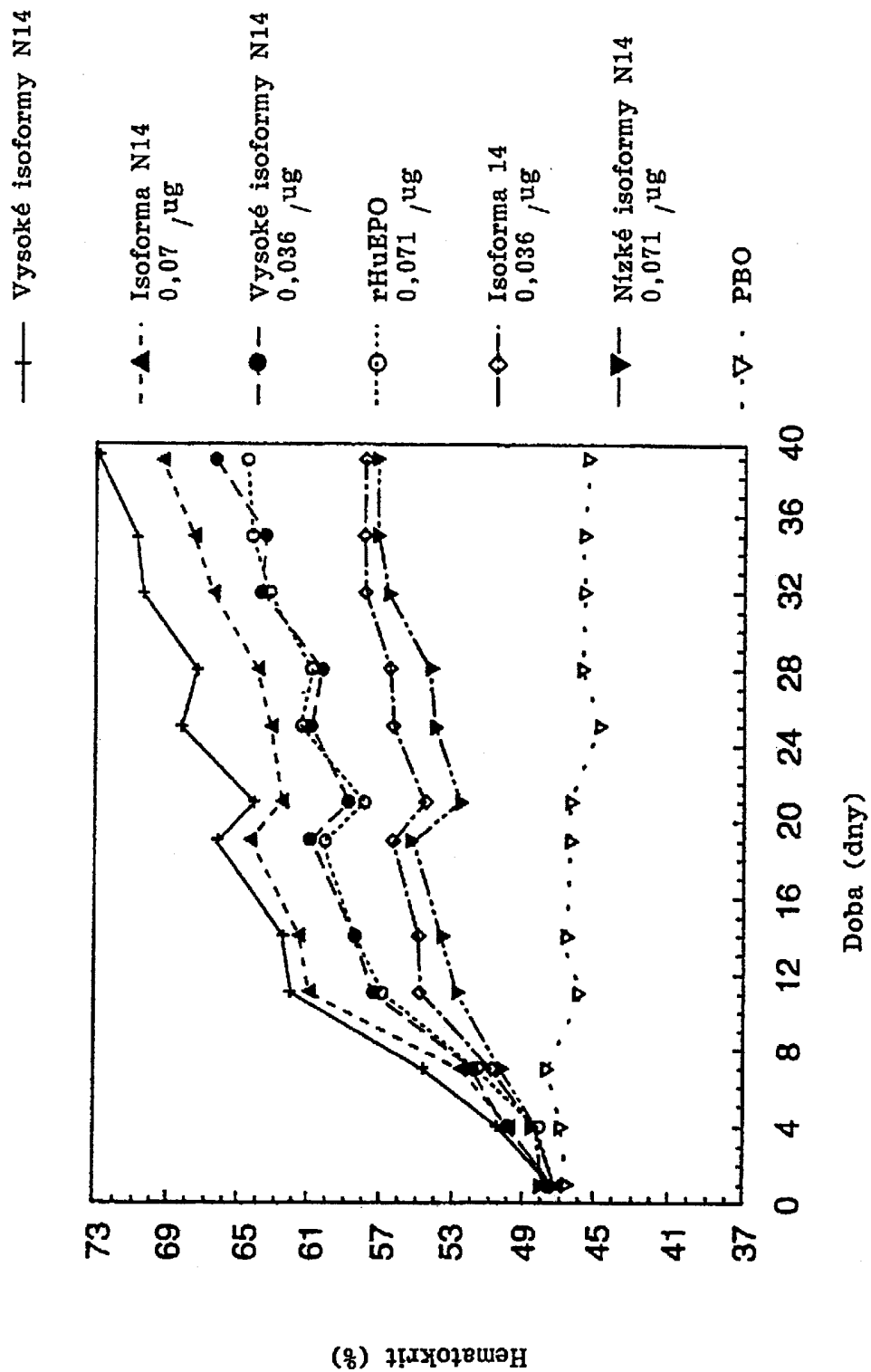
Obr.13



Obr.14



Obr. 15



Konec dokumentu