

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 501 996 A1 2006-12-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer:

A 2047/2004

(51) Int. Cl.⁸: **C12N 5/06** (2006.01),
A61K 38/18 (2006.01)

(22) Anmeldetag:

06.12.2004

(43) Veröffentlicht am:

15.12.2006

(73) Patentanmelder:

RED BULL GMBH
A-5330 FUSCHL AM SEE (AT)

(72) Erfinder:

LUBEC BARBARA DR.
WIEN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON HUMANEM SOMATOTROPIN**

(57) Verfahren zur Herstellung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), umfassend die Schritte:

- Vorsehen von Medulloblastom-Zellen,
- Züchten der Zellen in einem Kulturmedium und
- Isolieren des Wachstumshormons (GH, Somatotropin).

AT 501 996 A1 2006-12-15

Zusammenfassung:

Verfahren zur Herstellung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), umfassend die Schritte:

- Vorsehen von Medulloblastom-Zellen,
- Züchten der Zellen in einem Kulturmedium und
- Isolieren des Wachstumshormons (GH, Somatotropin).

NACHGEREICHT

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Wachstumshormon (growth hormone, GH, Somatotropin).

Das Wachstumshormon (GH, Somatotropin) ist aus einer einzigen Polypeptid-Kette aus 191 Aminosäure-Resten aufgebaut, hat ein Molekulargewicht von etwa 22 kDa und wird von somatotrophen Zellen des Vorderlappens der Hypophyse, die sich am Boden des Gehirns befindet, synthetisiert und in das Blut sezerniert. Es ist wesentlich beteiligt an der Steuerung mehrerer komplexer physiologischer Prozesse, einschließlich Wachstum (z.B. Knochenwachstum) und Stoffwechsel. GH ist auch für seine starke anabolische (Muskel aufbauende) sowie lipotrope (Aufschluss und Verwertung von Körperfett) Wirkung bekannt. Das Ergebnis dieser Wirkungen ist eine Zunahme der mageren Gewebemasse und eine Verringerung des Körperfetts. Weiters nimmt das GH mit dem Alter ab, und es zeigte sich, dass es viele der Wirkungen des Alterungsprozesses hintanhält, worauf es sich zeigte, dass die Verabreichung von GH die Alterung eines Individuums verlangsamt und bis zu einem gewissen Grad umkehrt. GH wird auch in pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Heilung von GH-Defizienzen (z.B. Hypopituitarismus, Somatotropin-Defizienz-Syndrom), die bei menschlichen Individuen auftreten, verwendet, welche ohne eine solche Behandlung beispielsweise in ihrem Wachstum eingeschränkt sein können. Weiters kann GH auch zur Behandlung von Alzheimer- und Parkinson-Krankheit verwendet werden. Bisher wurde GH für die Medikation von Kindern mit einer Wachstumshormon-Defizienz oder einer Insuffizienz, schwachem Wachstum infolge von Nierenversagen, Turner-Syndrom (Mädchen mit einem fehlenden oder fehlerhaften X-Chromosom), Prader-Willi-Syndrom (üblicherweise als Folge einer Disomie im Chromosom 15 bei einem Elternteil) und bei Kindern, die wegen des Gestationsalters klein geboren wurden und bis über das Alter von 2 Jahren hinaus schlecht wachsen, genehmigt. Bei Erwachsenen zählen zu den genehmigten Anwendungen mit AIDS verbundener Verfall und Wachstumshormon-Defizienz (gewöhnlich auf einen Hypophysen-Tumor zurückzuführen).

Auch in der Landwirtschaft gewinnt die Verwendung von GH zunehmend an Bedeutung. Dort wird GH beispielsweise den Rindern an der Schwanzspitze subkutan einmal alle 14 oder 28 Tage verabreicht, um die Milchproduktion zu steigern und die Effizienz der Futterverwertung zu verbessern. Es wird normalerweise nur an be-

NACHGEREICHT

stimmte weniger ertragreiche Kühe innerhalb einer Herde und nur während des späteren Zeitraums ihrer Milchproduktion verabreicht.

Aufgrund der Tatsache, dass GH humanen oder bovinen Ursprungs zur Behandlung klinischer Zustände von Menschen bzw. zur Verbesserung der Produktivität in der Landwirtschaft eingesetzt wird, besteht an der industriellen Produktion ein beträchtliches Interesse.

In den letzten Jahren ermöglichte die Entwicklung rekombinanter Technologien die Produktion von rekombinantem GH verschiedener Arten von Säugern (z.B. WO 02/051238, EP 0 280 407 B1, EP 0 159 123, EP 0 193 515). Obwohl Somatotropin rekombinant erzeugt wird, sind diese Somatotropine oft schwer zu formulieren, um sie einem Säuger wirksam zu verabreichen. Man fand heraus, dass im Unterschied zu solchen exprimierten Somatotropinen die Veränderung oder Eliminierung der Cystein-Reste, von welchen vier in Somatotropinen vorhanden sind, entweder durch Substitution durch eine andere Aminosäure oder durch Derivatisierung der Cysteine, zu biologisch aktiven Verbindungen mit verbesserter Stabilität führt, die in annehmbarer Weise für die Verabreichung an Säuger zu formulieren sind. GH rekombinanten Ursprungs unterscheidet sich jedoch in mehreren wichtigen Merkmalen von GH, das von Säugern stammt. In Sawada J. et al. (Mol. Immunol. 1986, 23:625-30) werden die Struktur- und Antigenitäts-Unterschiede zwischen rekombinantem und nativem humanem GH besprochen. Dabei konnte mit Hilfe von Kreuzreaktivitäts-Studien unter Verwendung von Antikörpern, die für rekombinantes und natives humanes GH spezifisch sind, gezeigt werden, dass die GHs beiderlei Ursprungs beträchtliche Unterschiede aufweisen. Zur Überwindung der Faltungsprobleme von rekombinant erzeugtem GH (die vor allem durch Cystein-Reste verursacht werden, die in der GH-Aminosäure-Sequenz vorhanden sind) sind im Stand der Technik mehrere Lösungen (z.B. Reinigungsmethoden) geoffenbart (z.B. St John RJ et al., J. Biol. Chem., 2001, 276:46856-46863, WO 00/12537, WO 90/15876, EP 0 477 198, EP 0 445 099 B, US 4 652 630).

Daher ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Verfahren und Mittel vorzusehen, die die Produktion von Wachstumshormon (GH, Somatotropin) mit denselben chemischen und sterischen Eigenschaften, denselben post-translationalen Modifikationen und

denselben biologischen Aktivitäten wie natürlich vorkommendes GH ermöglichen. Weiters können Verfahren für die Produktion von GH auch eine einfache und leichte Reinigung des Produkts ermöglichen, was zu hohen Ausbeuten führt.

Dieses Ziel wird durch ein Verfahren zur Produktion von Wachstumshormon (GH, Somatotropin) erreicht, umfassend die Schritte:

- Vorsehen von Medulloblastom-Zellen,
- Züchten der Zellen in einem Kulturmedium und
- Isolieren des Wachstumshormons (GH, Somatotropin).

Das Isolieren des GH aus Säuger-Zelllinien bietet mehrere Vorteile gegenüber rekombinant erzeugtem GH, weil der aus solchen Zelllinien isolierte GH korrekt gefaltet ist (es ist nicht notwendig, das Protein erneut zu falten), die post-translationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Glycosylierung) und die Aktivität identisch sind. Weiters behält aus Zelllinien gemäß der vorliegenden Erfindung isoliertes GH alle nativen Merkmale bei und ist mit dem direkt aus dem entsprechenden Säuger isolierten GH identisch. Daher kann es zweckmäßig für die direkte Verwendung in beispielsweise pharmazeutischen Zusammensetzungen benutzt werden.

Das Medulloblastom ist ein bösartiger Tumor, der aus wenig entwickelten Zellen in einem sehr frühen Stadium ihres Lebens gebildet wird. Diese Zellen entwickeln sich im Cerebellum, in der Fossa posterior des Gehirns, können sich aber auf andere Teile des Gehirns oder sogar auf andere Teile des Körpers ausbreiten, üblicherweise durch die Zerebrospinalflüssigkeit (CSF).

Das Medulloblastom kommt gewöhnlich bei Kindern, besonders im Alter von 7 und 12 Jahren, vor. Der Tumor ist in einem Verhältnis von 7:3 häufiger bei männlichen Individuen als bei weiblichen.

Infolge einer Blockade in den Ventrikeln (Flüssigkeits-gefüllte Räume im Gehirn), was zu einer Ansammlung von CSF führt oder durch Schwellungen um den Tumor selbst herum, wird das Vorhandensein eines Medulloblastoms üblicherweise durch einen erhöhten Druck innerhalb des Schädels bemerkt, der Kopfschmerzen, Erbrechen und Sehprobleme verursacht. Kinder erscheinen oft müde, schwach und reizbar, verbunden mit Persönlichkeits- und Verhaltensveränderungen.

Da das Cerebellum der Teil des Gehirns ist, der die Muskel-

NACHGEREICHT

Koordination steuert, kann ein Tumor in diesem Gebiet Probleme beim Gehen verursachen. Es kann den Anschein haben, dass eine Person stolpert oder auf ungeschickte oder unkoordinierte Weise geht. Es kann auch die Sprache betroffen sein, und die Wörter können undeutlich oder verwirrt sein.

Andere spezifische mit dem Medulloblastom verbundene Symptome sind Nystagmus (eine ruckartige Bewegung der Augen), Nackensteife und Muskelschwäche.

Robertson und Mitarbeiter berichteten eine gesteigerte Größe von Patienten mit Medulloblastom, was zur Vermutung führte, dass Medulloblastome durch Wachstumshormon-Produktion beeinflusst sein könnten oder Wachstumsfaktoren *in vivo* erzeugen könnten (1). Tatsächlich wird das Wachstumshormon Somatotropin (GH) nicht nur in der vorderen Hypophyse (2) erzeugt, sondern auch in einer Reihe anderer Gewebe und Zellarten, wenn auch in variablen Spleiß-Formen (3) und/oder post-translationalen Modifikationen (5-7).

Typischerweise sind Medulloblastom-Zellen von mit Medulloblastom befallenen Gehirngewebe oder von Zelllinien-Kollektionen, wie ATCC (American Type Culture Collection) oder DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erhältlich.

Die Zellen von Medulloblastom-Zelllinien werden gemäß den dem Fachmann bekannten Verfahren gezüchtet (Instruktionen vom Zelllinien-Lieferanten ATCC oder Veröffentlichungen, wie z.B. Chen TT et al., Cancer Res. 1975, 35:3566-70). Auch Ergänzungsmittel, die einen positiven Einfluss auf die Expression von GH in Medulloblastom-Zellen haben können, können den Kulturmedien zusätzlich hinzugefügt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass Medulloblastom-Zellen während der Züchtung GH in das Kulturmedium freisetzen, kann das Hormon aus dem Überstand leicht isoliert werden. Daher sind Medulloblastom-Zelllinien sehr für die Verwendung in kontinuierlichen Kulturen geeignet. Dabei kann der das GH enthaltende Überstand aus der kontinuierlichen Kultur entfernt werden (z.B. über kontinuierliches Zentrifugieren oder Querstromfiltration), wobei die Zellen im Fermenter zurückbleiben.

GH kann aus dem Kulturmedium und/oder aus den Zellen mittels im Stand der Technik bekannter Verfahren isoliert werden (z.B. Salas-Valdes A. et al., Arch. Invest. Med. (Mex). 1981, 12:431-

41; Conde R.D. et al., Eur. J. Biochem. 1973, 32:563-8; Skyler J.S. et al., Endocrinology. 1977, 100:283-91; Wood D.C. et al., J. Biol. Chem. 1989, 264:14741-7) und mittels Standard-Verfahren, die an die Isolierung von GH leicht adaptierbar sind.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die gezüchteten Zellen vor der Isolierung homogenisiert.

Um die Isolierung von GH aus Medulloblastom-Zellen zu verbessern, können diese Zellen während des Homogenisations-Schrittes lysiert werden. Diese Lyse kann mittels physikalischer oder chemischer Methoden erfolgen, wobei die ausgewählte Methode die Struktur und die Aktivität des isolierten Peptids nicht beeinträchtigen darf. Physikalische Methoden können beispielsweise die Verwendung von French Presses und/oder Gefrier/Auftau-Zyklen umfassen. Chemische Methoden können mit Detergentien (z.B. Alkylarylpolyetheralkohol (Triton X-100), Natriumdodecylsulfat, Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat (Tween 20) verbunden sein. Physikalische Methoden werden jedoch bevorzugt, weil sie nicht die Zugabe von Chemikalien erfordern, die die Aktivität des GH oder die weiteren Reinigungsschritte beeinflussen können. Insbesondere Detergentien können Probleme im Zuge der Reinigung verursachen.

Nach der Zell-Lyse müssen die festen Teile der Zelle (d.h., der Zellabfall) entweder durch Zentrifugieren oder durch Filtrieren unter Verwendung geeigneter niedrig Protein-bindender Filter („low protein binding filters“) entfernt werden. Nach der Zell-Lyse und dem Entfernen fester Teile sollte im Endprodukt keine lebende Zelle mehr vorhanden sein. Aus Sicherheitsgründen ist es jedoch wichtig, zu gewährleisten, dass keine lebende Zelle die Reinigung übersteht. Daher kann gegebenenfalls ein zusätzlicher Verfahrensschritt zur Analyse des Vorhandenseins solcher Zellen dem Isolationsverfahren hinzugefügt werden.

Vorzugsweise sind die Zellen humanen Ursprungs.

Das GH kann von einer humanen Medulloblastom-Zelllinie erzeugt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine Zelllinie, die Medulloblastom-Zellen umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DAOY (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-186), D283 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-185), D341 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-187) und Kombinationen davon.

NACHGEREICHT

Alle der oben erwähnten Zelllinien stammen direkt aus Gehirnen von Patienten, die an Medulloblastom leiden. Infolge der Tatsache, dass Medulloblastom-Zellen GH in vermehrtem Maß erzeugen können, kann jede bekannte Zelllinie, die von Personen, welche an einer solchen Krankheit leiden, verwendet werden.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von Zellen einer Medulloblastom-Zelllinie für die Isolierung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin).

Vorzugsweise sind die Medulloblastom-Zellen humanen Ursprungs.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine Zelllinie, die diese Zellen umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DAOY (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-186), D283 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-185), D341 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-187) und Kombinationen davon.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), erhältlich mit einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Wachstumshormon-Defizienzen, Turner-Syndrom, Wachstumshormon-abhängiger Hyposomie, Prader-Willi-Syndrom.

Die Herstellung von GH aufweisenden Medikamenten ist dem Fachmann wohl bekannt. Beispielsweise offenbart die EP 0 938 902 B1 eine wässrige pharmazeutische Zusammensetzung zur Injektion, die EP 0 787 497 A2, die EP 0 639 984, die EP 0 303 746 und die EP 0 618 807 beschreiben Zusammensetzungen, die GH und mehrere andere, beispielsweise heterozyklische, Verbindungen umfassen. Weiters kann mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung erhältliches GH als Zusammensetzungen zubereitet werden, die bereits für den kommerziellen Handel zugelassen sind (z.B. Genotropin von Pharmacia, Humatrope von Eli Lilly, Saizen von Serono, Norditropin von Novo Nordisk), die alle rekombinant erzeugtes GH verwenden.

Die vorliegende Erfindung wird durch das folgende Beispiel und die Figuren weiter veranschaulicht, ohne darauf eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt eine partielle 2-D-Elektrophorese-Gel-Abbildung der humanen Medulloblastom-Zelllinie (DAOY), welche *Somatotropin 1* zeigt, das mit dem Somatotropin-Präkursor (NCBI:AAA98618) hoch homolog ist. Proteine wurden extrahiert und auf einem immo-

NACHGEREICHT

bilisierten pH 3-10 nicht-linearen Gradienten-Streifen getrennt, gefolgt von einer Trennung auf einem Polyacrylamid-Gel mit einem 9-16% Gradienten. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt, und Spots wurden mittels MALDI-MS oder MS/MS analysiert.

Fig. 2 zeigt die Protein-Sequenz von *Somatotropin 1* mit einer Peptid-Übereinstimmung (fett), die eine Sequenz-Abdeckung von 62% aufweist.

Fig. 3 zeigt ein LIFT-TOF/TOF-Spektrum von m/z 1205.565, Zuordnung der identifizierten Sequenz 160-169: NYGLLYCFR (a) und ein Spektrum von m/z 2262.137, Zuordnung der identifizierten Sequenz 95-115: SVFANSLVYGASDSNVYDLLK (b), beide zu *Somatotropin* (NCBI:AAA98618).

Fig. 4. Ausrichtung („alignment“) der *Somatotropin 1* (S1)-Sequenz mit *Somatotropin* [Präkursor] (S, NCBI:AAA98618). 92%ige Identität wurde detektiert.

BEISPIEL:

Materialien und Methoden:

Die DAOY-Zelllinie (ATCC:HTB-186; (11)) wurde gemäß den spezifischen ATCC-Vorschriften (<http://www.lgcpromochem-atcc.com/SearchCatalogs/lor>) gezüchtet, homogenisiert, und die Proteine wurden gemäß biochemischen Standard-Verfahren extrahiert. Im Detail wurden die Zellen auf einem kompletten ATCC-Wachstumsmedium (Minimum essential medium (Eagle) mit 2 mM L-Glutamin und Earle's BSS so eingestellt, dass es 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren und 1,0 mM Natriumpyruvat, 90%; fötales Rinderserum, 10% enthielt) bei einer Temperatur von 37°C und unter einer Atmosphäre, die aus 95% Luft und 5% Kohlendioxid bestand, gezüchtet.

Eine zweidimensionale Gel-Elektrophorese wurde wie kürzlich berichtet (12) durchgeführt. 550 Mikrogramm Protein wurden auf immobilisierten, pH 3-10, nicht-linearen Gradienten-Streifen in Probetassen an ihren basischen und sauren Enden aufgetragen. Das Fokussieren wurde bei 200 V begonnen, und die Spannung wurde allmählich auf 5000 V mit einer Geschwindigkeit von 3 V/min gesteigert und danach weitere 24 h lang konstant gehalten (etwa 180.000 Vh insgesamt). Nach der ersten Dimension wurden die Streifen (13 cm) 15 min lang im Puffer, der 6 M Harnstoff, 20% Glycerin, 2% SDS, 2% DTT enthielt, äquilibriert, und danach 15 min lang im selben Puffer, der 2,5% Iodacetamid anstelle von DTT enthielt. Nach dem Äquilibrieren wurden Streifen auf 9-16%

Gradienten Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele zur zweidimensionalen Trennung geladen. Die Gele (180 x 200 x 1,5 mm) wurden bei 40 mA pro Gel laufen lassen. Unmittelbar nach dem Zweitdimensions-Lauf wurden die Gele 18 h lang in 50% Methanol, das 10% Essigsäure enthielt, fixiert, die Gele wurden mit kolloidalem Coomassie Blue (Novex, San Diego, Ca) 12 h lang auf einem Rocking Shaker gefärbt. Die Molekülmassen wurden durch Laufenlassen von Standard-Proteinmarkern (Biorad Laboratories, Hercules, CA), die den Bereich 10-250 kDa abdeckten, bestimmt. Die pI-Werte wurden verwendet, wie von der Lieferfirma der immobilisierten pH-Gradienten-Streifen angegeben (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden). Überschüssige Farbe wurde aus den Gelen mit destilliertem Wasser ausgewaschen, und die Gele wurden mit einem ImageScanner (Amersham Bioscience) gescannt.

Elektronische Abbildungen der Gele wurden unter Verwendung von Adobe Photoshop und Microsoft Power Point Softwares aufgezeichnet.

Spots wurden mit einem „Spot picker“ (PROTEINEER spTM, Bruker Daltonics, Deutschland) herausgeschnitten, in Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen gegeben, und ein in-Gel-Verdau und eine Proben-Zubereitung für MALDI-Analyse wurden mit einem automatisierten Verfahren durchgeführt (PROTEINEER dpTM, Bruker Daltonics) (13). Kurz gesagt wurden die Spots herausgeschnitten und mit 10 mM Ammoniumbicarbonat und 50% Acetonitril in 10 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Nach dem Waschen wurden Gel-Propfen („plugs“) durch Zugabe von Acetonitril geschrumpft und durch Ausblasen der Flüssigkeit durch den durchstochenen Boden der Vertiefung getrocknet. Die getrockneten Gel-Stücke wurden mit 40 ng/µl Trypsin (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) in Enzym-Puffer (bestehend aus 5 mM Octyl-β-D-Glucopyranosid (OGP) und 10 mM Ammoniumbicarbonat) wieder gequollen und 4 h lang bei 30°C inkubiert. Die Peptid-Extraktion wurde mit 10 µl 1% TFA in 5 mM OGP durchgeführt. Die extrahierten Peptide wurden direkt auf ein Ziel (AnchorChipTM, Bruker Daltonics) aufgetragen, das mit α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (Bruker Daltonics)-Matrix-Dünnschicht beladen war. Das bei dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer war ein UltraflexTM TOF/TOF (Bruker Daltonics), das im Reflektor für MALDI-TOF-Peptid-Massen-Fingerabdruck („fingerprint“) (PMF)- oder LIFT-Modus für MALDI-TOF/TOF mit einem vollständig automatisierten Modus unter Verwendung der

NACHGEREICHT

FlexControl™ Software betrieben wurde. Eine beschleunigende Spannung von 25 kV wurde für PMF verwendet. Das Kalibrieren des Instruments erfolgte von außen mit $[H+H]^+$ -Ionen von Angiotensin I, Angiotensin II, Substanz P, Bombesin und adrenokortikotropen Hormonen (Clip 1-17 und Clip 18-39). Jedes Spektrum wurde durch Ansammeln von Daten aus 200 aufeinander folgenden Laser-Beschüssen erzeugt. Jene Proben, die mittels PMF von MALDI-TOF analysiert wurden, wurden zusätzlich unter Verwendung von LIFT-TOF/TOF MS/MS vom selben Ziel analysiert. Ein Maximum von drei Präkursor-Ionen pro Probe wurde für die MS/MS-Analyse gewählt. Im TOF1-Stadium wurden alle Ionen auf 8 kV unter Bedingungen beschleunigt, die die metastabile Fragmentierung fördern. Nach der Selektion von gemeinsam wandernden Haupt- und Fragment-Ionen in einem zeitlich festgelegten Ionen-Gatter wurden die Ionen mittels 19 kV auf Hochspannungsenergie in der LIFT-Zelle gehoben. Nach einer weiteren Beschleunigung der Fragment-Ionen in der zweiten Ionen-Quelle konnten ihre Massen gleichzeitig im Reflektor mit hoher Empfindlichkeit analysiert werden. Die PMF- und LIFT-Spektren wurden mit der Mascot Software (Matrix Science Ltd, London, UK) interpretiert. Datenbanken-Abfragen durch Mascot unter Verwendung kombinierter PMF- und MS/MS-Datensets wurden über die BioTools 2.2 Software (Bruker) durchgeführt. Eine Massentoleranz von 100 ppm und 2 fehlende Schnittstellen für PMF- und MS/MS-Toleranz von 0,5 Da und 1 fehlende Schnittstelle für die MS/MS-Abfrage wurden zugelassen, und eine Oxidation von Methionin-Resten wurde in Betracht gezogen. Die von der Software berechnete Wahrscheinlichkeits-Bewertung wurde als Kriterium für die korrekte Identifizierung verwendet.

Der für die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Übereinstimmung mit einem gegebenen Massenspektrum verwendete Algorithmus ist an anderer Stelle beschrieben.

Ergebnisse

Ein einziger Spot (Fig. 1) auf 2D-Gelen wurde zweifellos als Somatotropin 1 auf Basis von MS- und MS/MS-Analyse identifiziert.

Das beobachtete, von MS erhaltene Molekulargewicht war 22343 Da (theoretisches Molekulargewicht 22129), der beobachtete pI war 5,4 (vorausgesager pI: 5,27).

Die Sequenz-Abdeckung (Fig. 2) war 62%, und die Anzahl der identifizierten Peptide war 11, wie mittels Massen-"fingerprin-

ting" gezeigt.

Die MS/MS-Spektren wurden von zwei, mittels MS identifizierten GH-Peptiden erzeugt, NYGLLYCFR (Fig. 3a) und SVFANSLVY-GASDSNVYDLLK (Fig. 3b), und die Somatotropin-1-Mutante G120 war somit zweifellos identifiziert.

Die identifizierten Peptide wiesen keine post-translationalen Modifikationen (ptms) auf, was das Vorhandensein üblicher ptms einschließlich Glykosylierung, Oxidation, Phosphorylierung, Trunkierung (6, 7, 14, 15) an anderen Somatotropin-1-Peptiden, die nicht identifiziert wurden, nicht ausschließt. Die Vorhersage von O- und N-Glykosylierung durch Vorlage identifizierter Peptid-Sequenzen zeigte eine Reihe von tentativen Glykosylierungs- oder Phosphorylierungsstellen auf (netNGlyc 1.0 Vorhersage; NetOGlyc 3.1 Server; NetPhos 2.0 Server).

Diskussion:

Methodologisch identifizierte MS/MS eindeutig das Vorhandensein der Somatotropin-1-Mutante G120 in DAOY-Zellen. Die biologische Relevanz kann die Bestimmung von Tumor-Zell-Merkmalen einschließlich Proliferation und Dignität an sich sein. Die Tumor-Zellen scheinen eigenes Wachstumshormon zu erzeugen. Der zelluläre Ursprung des Medulloblastoms lässt sich nicht festlegen und ist rein spekulativ, obwohl eine Reihe von Markern andeutete, dass die DAOY-Zelllinie hauptsächlich von Glia-Zellen abstammt (11). Bisher wurde weder bei neuronalen noch bei Glia-Zelllinien das Vorhandensein von Somatotropin 1 beschrieben. Jedoch ist die reichliche Expression von GH (vgl. den Spot in Fig. 1) sehr überraschend.

Literaturstellen:

1. Robertson SC, Ackerman LL, Traynelis VC. *Neurosurgery* 1997; 41(3): 561-6.
2. Zhan X, Desiderio DM. *Clin Chem* 2003; 49(5): 1740-51.
3. DeNoto FM, Moore DD, Goodman HM. *Nucl Acid Res* 1981; 9(15): 3719-30.
4. Boguszewski CL, Svensson PA, Jansson T, Clark R, Carlsson LM, Carlsson B. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(8): 2878-85.
5. Baumann G. *Horm Res* 1999; 51 Suppl 1: 2-6.
6. Garcia-Barros M, Costoya JA, Rios R, Arce V, Devesa J. *Horm Res* 2000; 53(1): 40-5.
7. Palmethofer A, Zechner D, Luger TA, Barta A. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 113(2): 225-34.
8. Zhan X, Desiderio, DM. *Proteomics* 2003; 3(5): 699-713.
9. Gil-Puig C, Blanco M, Garcia-Caballero T, Segura C, Perez-Fernandez R. *J Endocrinol* 2002; 173(1): 161-7.
10. Peyrl A, Krapfenbauer K, Slavc I, Yang JW, Czech T, Lubec G. *Proteomics* 2003; 3(9):1781-806.
11. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44(5): 472-85.
12. Weitzdoerfer R, Fountoulakis M, Lubec G. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293(2): 836-41.
13. Yang JW, Czech T, Lubec G. *Electrophoresis* 2004; 25(7-8): 1169-74.
14. Giorgianni F, Beranova-Giorgianni S, Desiderio DM. *Proteomics* 2004; 4(3): 587-98.
15. Lewis UJ, Singh NP, Bonewald F, Seavey BK. *J Biol Chem* 1981; 256(22): 11645-50.
16. Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sanchez-Franco F. *Endocrinol* 2003; 144(3): 1086-97.
17. Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR, Carter-Su C. *J Biol Chem* 1992; 267(9): 6074-80.
18. Patti R, Reddy CD, Geoerger B, et al.. *Int J Oncol* 2000; 16(3): 577-84.
19. Petersenn S, Maaser C, Schulte HM. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 129(1): 47-54.
20. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, et al.. *Nature Genetics* 2001; 29(2): 143-52.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), umfassend die Schritte:
 - Vorsehen von Medulloblastom-Zellen,
 - Züchten der Zellen in einem Kulturmedium und
 - Isolieren des Wachstumshormons (GH, Somatotropin).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die gezüchteten Zellen vor der Isolierung homogenisiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen humanen Ursprungs sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zelllinie, die diese Zellen umfasst, ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus DAOY (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-186), D283 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-185), D341 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-187) und Kombinationen davon.
5. Verwendung von Zellen einer Medulloblastom-Zelllinie für die Isolierung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin).
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen humanen Ursprungs sind.
7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zelllinie, die diese Zellen umfasst, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus DAOY (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-186), D283 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-185), D341 Med (ATCC Hinterlegungs-Nr. HTB-187) und Kombinationen davon.
8. Verwendung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Wachstumshormon-Defizienzen.
9. Verwendung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zur

NACHGEREICHT

Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Turner-Syndrom.

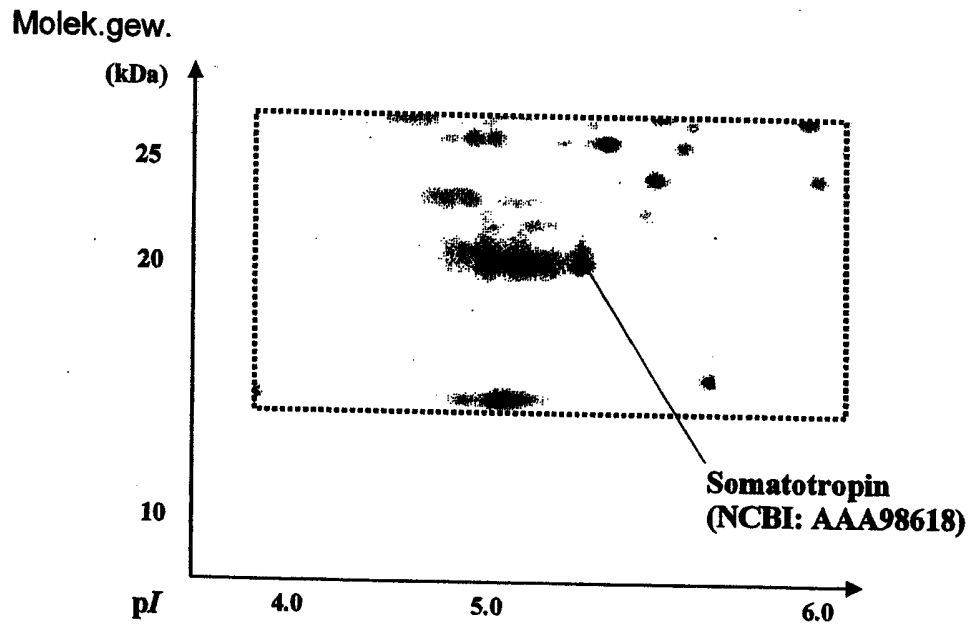
10. Verwendung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Wachstumshormon-abhängiger Hyposomie.

11. Verwendung von Wachstumshormon (GH, Somatotropin), erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Prader-Willi-Syndrom.

NACHGEREICHT

1/5

Fig. 1



NACHGEREICHT

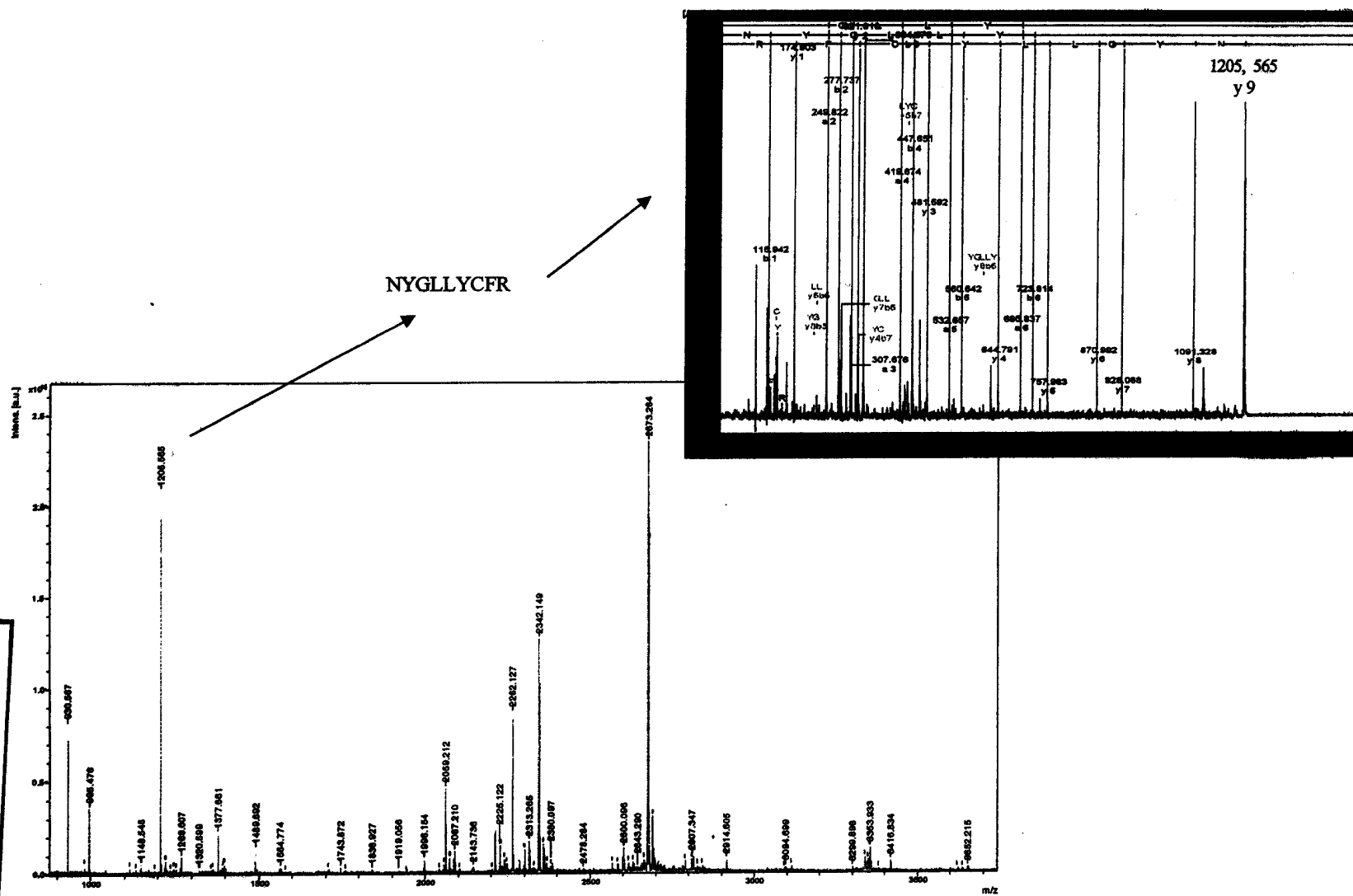
Fig 2.

Übereinstimmende Peptide **fett** gezeigt

1 **FPTIPLSRLF DNAMLRAHRL HQLAFD**TYQE** FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT**
51 **SLCFSESIPT PSNREET**QOK** SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS**
101 **LVYGASDSNV YDLLKDLEEG IQTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSK**FDTNS****
151 **HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV QCRSVEGSCG F**

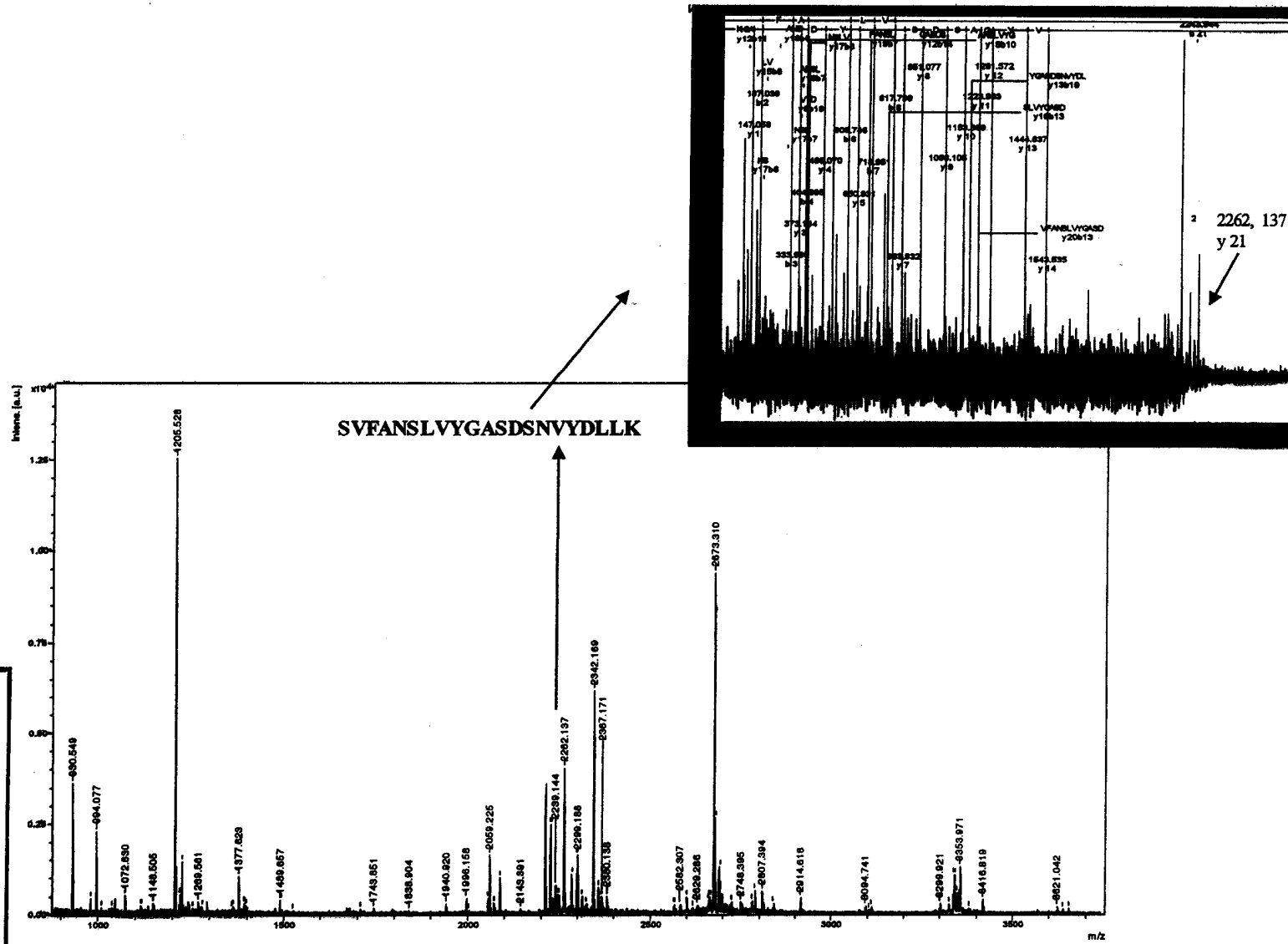
Fig 3a.

NACHGEREICHT



001510

Fig 3b.



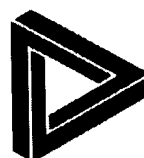
NACHGEREICHT

The image shows three 5x5 dot patterns arranged vertically. The top pattern represents the digit '8', the middle pattern represents the digit '0', and the bottom pattern represents the digit '6'. Each pattern is formed by black dots on a white background.

5/5
Fig 4.

Bewertung= 354 bits (909), erwartet= $4e-97$, Identitäten = 176/191 (92%),
Positive= 176/191 (92%)

S1 1 FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPT 60
S 27 FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPT 86
S1 61 PSNREETQOKSNXXXXXXXXXXXXXXXXXEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDL EEG 120
S 87 PSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDL EEG 146
S1 121 IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIV 180
S 147 IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIV 206
S1 181 QCRSVEGSCGF 191
S 207 QCRSVEGSCGF 217



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : C12N5/06; A61K38/18		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA:		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): C12N, A61K, C07K 14/435		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, Medline, Fulltext		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 11. Februar 2005 eingereichten Ansprüchen 1-11 erstellt.		
Kategorie ⁹	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	DD 257271 A1 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 8. Juni 1988 (08.06.1988) <i>das ganze Dokument</i>	1-11
A	Goldberg, T.B.L. et al. Growth hormone deficiency after treatment of medulloblastoma with radiotherapy in childhood: case report] Arquivos de neuro-psiquiatria (Zusammenfassung) MEDLINE [online], 2003, Vol. 61, Nr. 2B, Seiten 482-485 [heruntergeladen am 7. November 2005 (07.11.2005)] NLM12894290 <i>Medline-Zusammenfassung</i>	1-11
Datum der Beendigung der Recherche: 8. November 2005		☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER
⁹ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		