NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **309041** (13) B1

(51) Int Cl[7] C 07 K 14/755, C 12 N 15/12, 15/85, 5/16

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19922325	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1990.12.06, PCT/SE90/00809
(22) Inng. dag	1992.06.12	(85) Videreføringsdag	1992.06.12
(24) Løpedag	1990.12.06	(30) Prioritet	1989.12.15, SE, 8904239
(41) Alm. tilgj.	1992.08.11		
(45) Meddelt dato	2000.12.04		

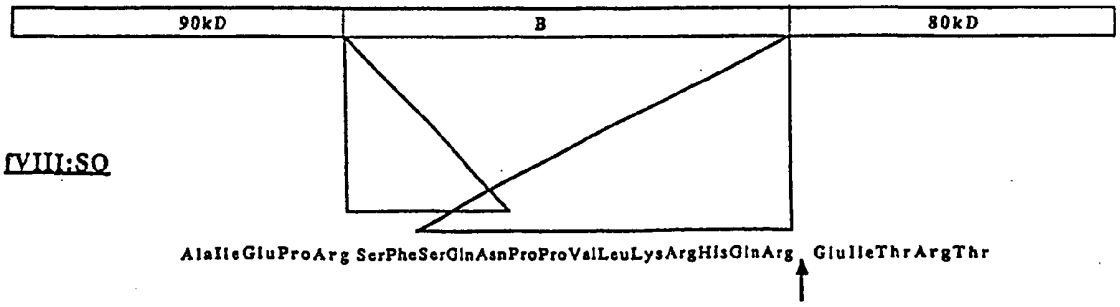
(71) Patenthaver Pharmacia & Upjohn AB, S-112 87 Stockholm, SE
(72) Oppfinner Annelie B. Almstedt, Stockholm, SE
Eva Maria Gray, Stockholm, SE
Kerstin Larsson, Kungsängen, SE
Peter Lind, Uppsala, SE
Helena Inga Sandberg, Bromma, SE
Jack Spira, Stockholm, SE
Mona Sydow-Bäckman, Saltsjöbaden, SE
(74) Fullmektig Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **DNA-sekvens, rekombinant ekspresjonsvektor og vertscelle omfattende DNA-sekvensen, samt fremgangsmåte for fremstilling av human faktor VIII-derivat**

(56) Anførte publikasjoner EP A 251841, EP A 303540, EP A 197901
The Journal of Cell Biology, vol. 105, nr. 6, 1987, s. 2665-2674
Biochemistry, vol. 25, nr. 26, 1986, s. 8343-8347

(57) Sammendrag

DNA-sekvens som koder for et biologisk aktivt rekombinant human faktor VIII-derivat, omfattende et første DNA-segment som koder for 90 kDa-kjeden til human faktor VIII og et annet DNA-segment som koder for 80 kDa-kjeden til human faktor VIII, idet nevnte segmenter er forbundet med et overgangs-DNA-segment som koder for et mellompeptid på 4 til omtrent 100 aminosyre-rester av B-området til human faktor VIII, der minst 4 av nevnte aminosyrerester stammer fra det C-terminale området; rekombinant ekspresjonsvektor omfattende en slik DNA-sekvens; vertsceller av dyreopprinnelse transformert med slik rekombinant ekspresjonsvektor; fremgangsmåte for fremstilling av rekombinant human faktor VIII-derivat; og human faktor VIII-derivat som inneholder den tunge kjeden og den lette kjeden bundet sammen ved metallionebinding.



Den foreliggende oppfinnelse omhandler en DNA-sekvens som koder for et biologisk aktivt rekombinant human faktor VIII-derivat, rekombinant ekspresjonsvektor som inneholder slik DNA-sekvens, vertsceller transformert med slik rekombinant ekspresjonsvektor og en fremgangsmåte for å lage det rekombinante humane faktor VIII-derivat.

Klassisk hemofili eller hemofili A er den mest kjente av de arvede blødersykdommene. Det er et resultat av en kromosom X-bundet mangel i blodkoagulasjonsfaktor VIII. Det rammer omtrent utelukkende menn, og hyppigheten er 1 til 2 individer pr. 10.000 menn. X-kromosom-mangelen blir overført av kvinnelige bærere som ikke selv er hemofilikere. Avhengig av mutasjonstypen i X-kromosomet, er faktor VIII enten ikke-funksjonell eller mangler, hvilket fører til en nedsatt blodkoagulering. Den kliniske utviklingen av hemofili A er en økt blødertendens, og før behandling med faktor VIII-konsentrater ble innført, var den gjennomsnittlige levetid for en person med alvorlig hemofili A mindre enn 20 år. Bruken av konsentrater av faktor VIII fra plasma har forbedret betraktelig situasjonen for hemofili-pasientene. Den gjennomsnittlige levetiden har økt sterkt, og flesteparten av pasientene har muligheten til å leve et mer eller mindre normalt liv. Imidlertid har det vært visse problemer med konsentratene og deres anvendendelse. Den mest alvorlige har vært overføring av virus. Hittil har virus som forårsaker AIDS, hepatitt B, og non-A eller non-B hepatitt rammet hemofili-befolkningen alvorlig. Nylig har forskjellige virus-inaktiveringsfremgangsmåter blitt innført i produksjonen av mange kommersielle konsentrater. Det finnes også nye, meget rensede faktor VIII-konsentrater som kommer ut på markedet, som er forventet å bli meget tryggere sammenlignet med tidligere konsenetrater med hensyn til risiko for virusoverføring. Imidlertid kan ingen garantier bli gitt når det gjelder fravær av virus. Videre er konsentratene relativt kostbare fordi utgangsmaterialet plasma er dyrt på grunn av begrenset tilgang.

Rekombinant faktor VIII vil sannsynligvis løse i stor grad problemene forbundet med bruk av plasma avledet faktor VIII-konsentrater. I lys av behovet for rekombinant faktor VIII i

behandlingen av hemofili A, arbeider et par grupper for tiden med utviklingen av et slikt produkt. Imidlertid har utviklingen av et rekombinant faktor VIII møtt visse vanskeligheter. En av hovedproblemene skyldes produksjon av rekombinant faktor VIII med tilstrekkelig høyt utbytte. Mesteparten av utviklingsarbeidet som er utført er blitt gjort med bruk av cDNA som koder for full-lengdefaktor VIII molekylet.

Denne oppfinnelsen beskriver en forkortet faktor VIII cDNA som koder for et rekombinant faktor VIII-derivat, hvilket korresponderer til, med hensyn til molekylvekt og andre biokjemiske karakteristika, en tidligere beskrevet plasmafaktor VIII-form som er tilstede i betraktelige mengder i kommersielle konsentrater. (Anderson, L-O, et al (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2979-2983). Produksjonsnivået som er oppnådd ved å uttrykke dette molekylet i en dyrecellekultur, har vist seg å være betraktelig høyere når det blir sammenlignet med full-lengde faktor VIII cDNA benyttet for å uttrykke faktor VIII. Det nye forkortede faktor VIII cDNA gir sannsynligvis tilstrekkelig høyt utbytte med rekombinant faktor VIII, slik at det kan benyttes i en industriell fremgangsmåte for å lage et farmasøytisk preparat av rekombinant faktor VIII.

I de følgende avsnitt er nomenklaturen til de forskjellige strukturelle områdene av 2332 aminosyreenkeltkjedet full-lengde faktor VIII lik de som er definert av Vehar, GA, et al (1984), Nature 312, 337-342). Følgelig er A1 og A2 områdene inneholdt i faktor VIII tungkjede på omtrent 200 kDa (aminosyrer 1 til 1648) til omtrent 90 kDa (aminosyrene 1 til 740). A3, C1 og C2 områdene er inneholdt innenfor faktor VIII lett-kjede på omtrent 80 kDa (aminosyrene 1649 til 2332). B-området består av det sterkt glykosylerte midtområdet i full-lengde enkelkjedet faktor VIII eller den C-terminale delen av 200 kDa formen til faktor VIII tunge kjede (aminosyrene 741 til 1648). Betegnelsen "faktor VIII delesjon (forkortet) derivat" er definert som én eller flere polypeptidkjeder som har faktor VIII:C aktivitet som stammer fra full-lengde faktor VIII polypeptidet ved å fjerne én eller flere aminosyrer. Betegnelsen "faktor VIII:QD" er definert som en polypeptidkjede som stammer fra full-lengde

faktor VIII som mangler aminosyrene 745 til 1562. Betegnelsen "faktor VIII:RE" er definert som en polypeptidkjede som stammer fra full-lengde faktor VIII som mangler aminosyrene 741 til 1648. Betegnelsen "faktor VIII:SQ" er definert som en polypeptidkjede som stammer fra full-lengde faktor VIII som mangler aminosyrene 743 til 1636.

I frisk plasma fremstilt i nærvær av proteaseinhibitorer, har faktor VIII vist seg å ha en molekylvekt på 280 kDa og være sammensatt av 2 peptidkjeder med molekylvekter på henholdsvis 200 kD og 80 kD (Andersson, L-O et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 83, 2979-2983). Disse kjedene blir holdt sammen av metallionebroer. Mer eller mindre proteolytiske degraderte former av faktor VIII molekylet ble funnet som aktive fragmenter i faktor VIII-renset materiale fra kommersielle konsentrater (Andersson, L-O et al. 1986; Andersson et al (1985) EP 0197901). De fragmenterte former av faktor VIII har molekylvekter fra 260 kD ned til 170 kD, og består av en tungkjede med en molekylvekt som varierer fra 180 kD ned til 90 kD (alle varianter har identiske N-termini) i kombinasjon med 80 kD lette-kjede. Den N-terminale regionen i de tunge kjedene er identisk til det i enkeltkjede faktor VIII som er oppnådd fra nukleotidsekvens-resultatene til faktor VIII cDNA (Wood, W.I., et al. (1984) Nature 312, 330-336, Vehar, G.A., et al., (1984) Nature 312, 337342).

Den minste aktive form, med molekylvekt 170 kDa, inneholder en 90 kD og en 80 kD kjede kunne bli aktivert med trombin til samme grad som de høyere molekylære formene. Det representerer således en ikke-aktivert form. Det har også blitt vist å ha full biologisk aktivitet *in vivo* som testet i hemofilihunder (Brinkhous, K.M. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8752-8756). Således var den hemostatiske effektiviteten den samme som for høymolekylvektformene til faktor VIII. Videre var det en indikasjon på at 170 kD formen hadde en *in vivo* overlevelsestid som var 50% lengre sammenlignet med den til de høyere molekylvektformene.

Det faktum at den midtre, sterkt glykosylerte delen av faktor VIII polypeptidkjeden mellom aminosyrene Arg-739 og

Glu-1649 ikke synes å være nødvendige for full biologisk aktivitet, har ledet flere forskere til å forsøke å lage derivater av rekombinant faktor VIII som mangler denne regionen. Dette er blitt oppnådd ved å fjerne en del av cDNA som koder for den midtre, sterkt glykosylerte delen til faktor VIII enten helt eller delvis. F.eks., J.J. Toole, et al. omtalte konstruksjon og produksjon av faktor VIII som mangler aminosyrene henholdsvis 982 til 1562, og 760 til 1639, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83, 5939-5942). D.L. Eaton et al. omtalte konstruksjonen og produksjonen av faktor VIII som manglet aminosyrene 797 til 1562 (Biochemistry (1986) 25, 8343-8347). R.J. Kaufman beskrev produksjon av faktor VIII som manglet aminosyrene 741 til 1646 (PCT søknad No. WO 87/04187). N. Sarver et al. omtalte konstruksjonen og produksjonen av faktor VIII som manglet aminosyrene 747 til 1560 (DNA (1987) 6, 553-564). M. Pasek omtalte konstruksjonen og produksjonen av faktor VIII som manglet henholdsvis aminosyrene 745 til 1562, og aminosyrene 741 til 1648 (PCT søknad nr. 88/00831). K-D Langner omtalte konstruksjon og produksjon av faktor VIII som manglet henholdsvis aminosyrene 816 til 1598, aminosyrene 741 til 1689 (Behring Inst. Mitt., (1988) No.82, 16-25, EP 295 597). P. Meulien, et al., omtalte konstruksjonen og produksjonen av faktor VIII som manglet henholdsvis aminosyrene 868 til 1562, og aminosyrene 771 til 1666. (Protein Engineering (1988) 2(4), 301-306, EP 0 303 540 A1). Når disse forkortede formene av faktor VIII cDNA ble uttrykt i pattedyrceller, er produksjonen vanligvis 10 ganger høyere enn sammenlignet med full-lengde faktor VIII.

Videre har forsøk blitt gjort på å produsere 90 kD og 80 kD kjedene hver for seg fra to forskjellige cDNA derivater i samme celle. (Bruke, R.L. et al. (1986), J.Biol.Chem. 261, 12574-12578, Pavirani, A. et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm. 145, 234-240). Imidlertid i dette systemet synes *in vivo* rekonstitusjonen å ha begrenset effektivitet med hensyn til den gjenvunne faktor VIII:C aktivitet.

Den foreliggende oppfinnelse omhandler fremgangsmåter for å produsere proteiner som består av én eller flere polypeptidkjeder som har faktor VIII:C aktivitet. Mer spesifikt gir den

foreliggende oppfinnelse en modifisert cDNA sekvens som stammer fra full-lengde faktor VIII cDNA som, når det uttrykkes i dyreceller, gir opphav til høye produksjonsnivåer av et protein med faktor VIII:C aktivitet som i det vesentlige består av 2 polypeptidkjeder på henholdsvis 90 kD og 80 kD molekylvekt.

Følgelig gir den foreliggende oppfinnelse en DNA-sekvens som koder for biologisk aktiv rekombinant humant faktor VIII-derivat som omfatter to polypeptidkjeder på henholdsvis 90 kDa og 80 kDa, idet nevnte DNA sekvens er istand til å uttrykke i en egnet vertscelle og utskille nevnte derivat fra cellen kjennetegnet ved at den omfatter et første DNA-sekgment som koder for 90 kDa-kjeden til human faktor VIII og et annet DNA-segment som koder for 80 kDa-kjeden til humant faktor VIII, idet nevnte segmenter er bundet sammen av et mellomliggende (linker) DNA-segment som koder for et mellompeptid på opp til 20 aminosyrerester av B-området i human faktor VIII, idet minst 4 av nevnte aminosyrerester stammer fra den C-terminale del av nevnte område.

I en spesielt foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen inneholder nevnte DNA-sekvens en overgang som koder for en aminosyresekvens som består av 12 aminosyrer som stammer fra B-området i human faktor VIII.

Som et foretrukket eksempel kan nevnte overgang kode for minst 7 aminosyrerester i B-området av human faktor VIII, minst 4 aminosyrerester stammer fra C-terminalen, og minst 2 aminosyrerester stammer fra den N-terminale del av nevnte område.

I en spesifikk utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, inneholder DNA-sekvensen et mellomliggende segment som koder for 12 aminosyrerester som stammer fra C-terminalen og 2 aminosyre-rester som stammer fra N-terminalen i B-området av human faktor VIII.

Oppfinnelsen omfatter også en rekombinant produksjonsvektor som er i stand til å uttrykke det gitte genet og som inneholder en transkripsjonsenhet som består av cDNA-sekvensen som beskrevet ovenfor og, videre, en promotor og en polyadenylering signalsekvens.

Oppfinnelsen dekker også vertsceller av dyreopprinnelse

kjennetegnet ved at de er transformert med den rekombinante produksjons (ekspresjons)-vektoren som definert ovenfor. I tillegg omtaler oppfinnelsen en fremgangsmåte for å produsere et biologisk aktivt rekombinant humant faktor VIII-derivat som beskrevet ovenfor, nevnte fremgangsmåte omfatter dyrking av en dyrecellelinje som er transformert med en rekombinant produksjonsvektor som definert ovenfor i et næringsmedium som tillater ekspresjon og sekresjon av human faktor VIII-derivat som består av det 90 kD området og, bundet til det via metallionbinding, 80 kD området, nevnte uttrykte derivat blir så gjenvunnet fra kulturmediet.

Endelig omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et human faktor VIII-derivat som er karakterisert av 90 kD-området og, bundet til det, via mellompeptidet eller del av dette, ved hjelp av metallionebinding, 80 kD-området i human faktor VIII.

For å oppnå et protein med faktor VIII:C aktivitet som består av de ovenfor nevnte to polypeptidkjedene, må den enkle polypeptidkjeden laget under translasjon *in vivo* bli spaltet enten ved post-translasjonell behandling i den produserende celle eller ved proteolytisk spaltning *in vitro*, eller begge. Siden proteinet med faktor VIII-aktivitet, bestående av de to polypeptidkjedene på 200 kD og 80 kD molekylvekt, kan bli isolert fra humant plasma, antas det at det eksisterer et tilpasset spaltningssete for prosesseringsenzymer, ifølge ovenfor, av det enkeltkjede full-lengde faktor VIII primære translasjonsprodukt. Mest sannsynlig er en viktig *in vivo* spaltningsdel lokalisert ved den karboksyterminale siden av Arg-1648. Under modning, gir spalting ved Arg-1648 opphav til et faktor VIII protein som består av 2 kjeder med molekylvekter på 200 kD og 80 kD. Siden Arg-1648 synes å være lokalisert på grensen mellom struktur-området i faktor VIII-molekylet, består det av en sterisk til-gjengelig del for prosesseringsenzymet eller enzymene. Trolig eksisterer et annet spaltningssete ved Arg-740 som vil gi opphav til overføring av 200 kD kjeden til en 90 kD kjede *in vitro*, hvilket lager 90 kD og 80 kD formen av faktor VIII som er tilstede i faktor VIII konsentrater fra

kommersielt human plasma. Ifølge den foreliggende oppfinnelse er det blitt funnet at for å lage et faktor VIII avkortet derivat som kan bli behandlet enten *in vivo* eller *in vitro*, eller begge deler, til et tokjedet protein som består av polypeptidkjedene på 90 og 80 kD, må aminosyresekvensene rundt Arg-740 og Arg-1648 beholdes for å bevare de strukturelle krav for korrekt spaltning. Mer spesifikt, hvis f.eks. aminosyrene 743 til 1636 i full-lengde faktor VIII polypeptidet blir fjernet, blir en ny polypeptid-kjede oppnådd hvor det er 14 aminosyrer som binder sammen Arg-740 og Arg-1648. Av disse 14 aminosyrene, korresponderer sekvensen til de 5 aminoterminale direkte med de 5 aminosyrene som etterfølger Arg-740 i full-lengde faktor VIII. Også, sekvensen til de 12 karboksyterminale aminosyrene av det ovenfor nevnte 14 aminosyrefragmentet svarer direkte til de 12 aminosyrene som finnes i Glu-1649 i full-lengde faktor VIII og lager således en tre aminosyre-overlapping mellom det N- og C-terminale området i B-området.

For å lage et faktor VIII:SQ protein med høyt utbytte, hvilket består av 2 polypeptidkjeder ifølge ovenfor, blir cDNA som koder for denne faktor VIII-forkortelsen satt sammen til en effektiv transkripsjonsenhet sammen med passende regulatoriske elementer i en kloningsvektor, som kan bli ført videre i *E.coli* ifølge fremgangsmåtene som er kjent for de som er erfarne på området. Effektive transkripsjonsregulerende elementer kan stamme fra det kromosomale DNA i eukaryote celler. F.eks. kan promotor-enhancerkombinasjoner fra sterke, konstitutivt (permanent) transkriberte gener bli benyttet, fortrinnsvis metallotionin, beta-aktin eller GRP78. Også effektive trans-kripsjonsregulerende elementer kan stamme fra virus som har eukaryote celler som deres naturlige verter. F.eks., kan promoter-enhancer-kombinasjoner som stammer fra virus i dyreverter bli benyttet, fortrinnsvis enhancer og promoter som forekommer i Rous sarcoma-virus lange terminale, repeterte sekvens, simian virus 40, adenovirus hoved-sen-promoter, og humant cytomegalovirus straks-tidlig promotor. For å oppnå et stabilt, høyt produksjonsnivå av mRNA transkribert fra faktor VIII:SQ cDNa, skulle transkripsjonsenheten inneholde i sin

3-merkede proksimale del en DNA-region som koder for en transkripsjonsterminerings-polyadenyleringssekvens. Fortrinnsvis, stammer sekvensen fra Simian Virus 40 tidlig transkripsjons region eller kanin beta-globulingenet.

Faktor VIII;SQ cDNA samlet til en effektiv transkripsjonsenhet blir innført i en passende vertsorganisme for produksjon av faktor VIII:SQ proteinet. Fortrinnsvis skulle denne organisme være en dyrecellelinje fra vertebrater for å sikre riktig folding, disulfidbrodannelse og sekresjon såvel som andre post-translasjonelle modifikasjoner. Eksempler på den sistnevnte er asparaginbundet glykosylering, tyrosin O-sulfatering, og proteolytisk spalting av den voksende, enkle polypeptidkjede som er vesentlig for dannelsen av 90 kD og 80 kD 2-kjede faktor VIII-proteinet. Eksempler på cellelinjer som kan bli benyttet er ape-COS-celler, muse-L-celler, muse-C127-celler, hamster BHK-21-celler og fortrinnsvis CHO-celler.

Transkripsjonsenheten som koder for faktor VIII:SQ cDNa kan bli innført i en dyrecellelinje på forskjellige måter. Et eksempel på dette er å lage rekombinanter mellom den ovenfornevnte transkripsjonsenhet og vektorer basert på forskjellige dyrevirus. Eksempler på dette er vektorer basert på vaccinia virus, SV40 virus, og fortrinnsvis bovint (storfe) papilloma virus.

Transkripsjonsenheten som koder for faktor VIII:SQ cDNA kan også bli innført i en dyrecellelinje sammen med et annet rekombinant gen som kan fungere som en dominerende seleksjonsmarkør i disse celler for å underlette isoleringen av spesifikke cellekloner som har integrert det rekombinante DNA i genomet. Eksempler på denne type av dominerende seleksjonsmarkørgener er Tn5 aminoglykosidfosfotransferase (resistent overfor puromycin G418), og puromycin acetyltransferase (resistent overfor puromycin). Transkripsjonsenheten som koder for et slikt seleksjonsmarkørgen kan ligge enten på samme vektoren som den som koder for faktor VIII:SQ-enheten. Den kan også bli kodet for på en separat vektor som blir samtidig innført og integrert i genomet i vertscellen, ofte resulterer dette i tett fysisk binding mellom de forskjellige transkripsjonsenhetene.

Andre typer av dominerende seleksjonsmarkørgener som kan bli benyttet sammen med faktor VII:SQ cDNA er basert på forskjellige transkripsjonsenheter som koder for dihydrofolat-reduktase (dhfr). Etter innføring av denne type gen i celler som mangler endogen dhfr-aktivitet - fortrinnsvis CHO-celler - (DUKX-B11, DG-44), vil det sette disse istand til å gro i medium som mangler nukleosidase. Eksempler på et slikt medium er Ham's F12 uten hypoxantin, thymidin og glycin. Disse dhfr-genene kan bli benyttet sammen med faktor VIII:SQ transkripsjonsenhet i CHO-celler av den ovenfor nevnte type, enten bundet i den samme vektoren eller i to forskjellige vektorer, således lage dhfr-positive cellelinjer som lager rekombinant faktor VIII:SQ protein.

Hvis de ovenfor nevnte cellelinjene blir dyrket i nærvær av cytotoksi-dhfr-inhibitor metotreksat, vil nye cellelinjer som er resistente til metotreksat utvikles. Disse cellelinjene kan lage rekombinant faktor VIII:SQ protein i øket mengde på grunn av det økede antall av bundet dhfr og faktor VIII:SQ transkripsjonsenheter. Når disse cellelinjene blir ført videre i økende konsentrasjoner av metotreksat (1-10.000 nM), kan nye cellelinjer oppnås som lager faktor VII:SQ proteinet med høyt utbytte.

De ovenfor nevnte cellelinjene som produserer faktor VIII:SQ proteinet kan dyrkes i stor skala, enten i suspensjonskultur eller på forskjellig fast underlag. Eksempler på disse underlag er mikrobærere basert på dekstran eller kollagen-underlag, eller fast underlag i form av hule fibre eller forskjellige keramiske materialer. Når det blir dyrket i suspensjonskultur eller på mikrobærere, utføres dyrkingen av de ovenfor nevnte cellelinjer enten som en "batch" (samle)-kultur eller som en perfusjonskultur med kontinuerlig produksjon av "kondisjonert" (brukt) medium i lengre tid. Således, ifølge den foreliggende oppfinnelse, er ovenfor nevnte cellelinjer tilpasset utviklingen av en industriell fremgangsmåte for å produsere rekombinant faktor VIII:SQ som gir den autentiske (riktige) 2-polypeptidkjede faktor VIII (90 kD og 80 kD) som kan isoleres fra humant plasma.

Rekombinant faktor VIII:SQ proteinet som samles i medium til CHO-celler nevnt ovenfor, kan konsentreres og renses ved hjelp av en rekke biokjemiske fremgangsmåter, inklusive fremgangsmåter som benytter forskjeller i størrelse, ladning, løsning, hydrofobisitet, spesifikk aktivitet, osv. mellom rekombinant faktor VIII:SQ og andre forbindelser i det brukte medium.

Et eksempel på slik opprenskning er adsorbsjonen av det rekombinante faktor VIII:SQ proteinet til et monoklonalt antistoff som er immobilisert på et fast underlag. Etter desorbsjon (løsning), kan faktor VIII:SQ proteinet renses videre ved hjelp av en rekke kromatografiske fremgangsmåter basert på de ovenfor nevnte evnene.

Protein med faktor VIII aktivitet beskrevet i denne oppfinnelse kan bli laget til farmasøytiske preparater for terapeutisk bruk. Det produserte rekombinante faktor VIII:SQ proteinet blir løst opp i vanlige fysiologiske, tilpassede, vandige bufferløsninger som tilsettes, valgfritt, farmasøytiske tilsetninger for å gi farmasøytiske preparater.

Den foreliggende oppfinnelse vil beskrives mer i detalj i de følgende ikke-begrensende eksemplene. Denne beskrivelse av spesifikke utførelsesformer av oppfinnelsen vil gjøres, sammen med de ledsagende tegningene, hvor

Figur 1 er en skjematisk tegning av forholdet mellom fullengde faktor VIII og faktor VIII:SQ. Den primære strukturen til området mellom C-terminus av 90 kD kjeden og N-terminus av 90 kD kjeden er vist. Den vertikale pilen viser peptidbindingen som blir spaltet for å gi 2-kjede-produktet;

Figur 2 er en illustrasjon av plasmid pKGE436 som inneholder faktor VIII:SQ cDNA under transkripsjonskontroll av den humane cytomegalovirus promoteren;

Figur 3 er en illustrasjon av plasmid pKGE327 som inneholder muse-dihydrofulat reduktase cDNA under transkripsjonskontroll av muse-mamma tumorvirus lange terminale repeterte sekvens;

Figur 4 er en illustrasjon av immum-blot av rekombinant faktor VIII:SQ etter polyakrylamid gelelektroforese i nærvær av

natriumdodecylsulfat;

Figur 5 viser et diagram med hensyn til forandringer i faktor VIII aktivitet i rekombinant faktor VIII:SQ etter inkubasjon med trombin; og

Figur 6 illustrerer forandringer i mønsteret av SDS-PAGE og immunoblot av rekombinant faktor VIII:SQ etter inkubasjon med human α-trombin.

Eksempel 1

Et delesjonsderivat av faktor VIII cDNA konstrueres som koder for et polypeptid som mangler mesteparten av B-området, men som inneholder deler av de aminoterminale og karboksyterminale sekvensene i B-området som er vesentlig for *in vivo* proteolytisk spaltning av det primære translasjonsprodukt i to polypeptid-kjeder.

Mutagenese av faktor VIII cDNA

Et 894 base-par KpnI-PstI restriksjonsfragment som oppnås fra cDNA av faktor VIII:CD delesjonsderivatet (M. Pasek, PCT søknad nr. WO88/00831) som koder for aminosyrene Leu 587 til Ala 1702 ble innført i bakteriofagvektor M13mp19 (Yanisch-Perron, C. et al. (1985) Gene 33, 103-119), ifølge standard fremgangsmåter i feltet. Den resulterende rekombinante fagklon ble benyttet som kilde for å lage enkeltkjedet DNA som benyttes som templat for oligonukleotidrettet mutagenese (Nakamaye, K. og Eckstein, F (1986) Nucleic Acids Res. 14, 9679-9698) 10μg renset sirkulært enkeltkjedet vektor DNA ble bundet til 8 pmol 5'-fosforylert oligomukleotid med den følgende sekvensen:
5'-GCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCTCAGAATCCACCAGTCTTGAAACGC-3'.

Den andre kjeden av sirkulært DNA ble syntetisert på det resulterende templatet ved tilsetning av alle fire deoksy-nukleotidene, dCTPαS, 12 enheter Klenow fragment av DNA-polymerase I, og 12 enheter av T4 DNA-ligase. Etter overnatts inkubering ved 16°C, ble reaksjonsblandingen anriket for dobbeltkjedet DNA ved hjelp av filtrering gjennom nitro-cellulose i nærvær av 500 mM NaCl. En femdel av det rensede dobbeltkjedede DNA ble spaltet (nicket) ved inkubasjon med 5

enheter av restriksjonsenzym NciI, behandlet med 50 enheter Exonuklease III til en slik grad at templatkjeden i fag DNA ble delvis fjernet. Resulterende, delvise duplekser ble tilbakeført til dobbeltkjedet DNA ved behandling med 3 enheter polymerase I og 2 enheter T4 DNA-ligase i nærvær av alle fire deoksynukleotid trifosfatene ved 16°C i 3 timer. En firedel av den resulterende blandingen ble benyttet for å transformere 300 µl *E. coli* TG1. Av de resulterende mutageniserte phag-klonene, ble 10 gjenstand for dideoksy-sekvensering (Sanger, F. et al. 1977, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 74, 5463-5467). En av de resulterende fag-klonene viste den forventede nukleotidsekvensen, hvilket indikerte at et 228 basepar segment hadde blitt fjernet, hvilket svarte til aminosyrene Asp 1563 til Ser 1637 av faktor VIII:QD. Dette lager et nytt 666 base-par KnpI-PstI fragment av faktor VIII cDNA innenfor M13mp19 vektoren som koder for en fusjon mellom Phe 742 og Ser 1637 i faktor VIII-proteinet (faktor VIII:SQ).

Konstruksjon av en pattedyrekspresjonsvektor som koder for faktor VIII:SQ

666 basepar KpnI-PstI fragmentet som koder for faktor VIII:SQ fusjonen ifølge det som er nevnt ovenfor, ble isolert fra den dobbeltkjedede replikerende form av M13mp19 fag DNA og satt inn i vektoren pKGE431. Denne vektor består av et 2046 base-par KpnI-SphI fragment fra faktoren VIII:RE cDNA (M.Pasek, PCT søknad nr. WO88/00831, ATCC tilgangsnr. 53517) som koder for aminosyrene Leu 587 til Met 2176 i faktor VIII:RE proteinet i pUC19. For å tilpasse faktor VIII:SQ 666 base-par KpnI-PstI fragmentet på en ønsket måte, måtte pKGE431 DNA spaltes ved hjelp av fullstendig kpnI fordøyelse og delvis PstI fordøyelse. Fragmentet av pKGE431, hvor PstI er spaltet i en posisjon som korresponderer til Ala 1702 i faktor VIII:RE proteinet ble isolert og bundet til det ovenfor nevnte kpnI-PstI fragmentet i faktor VIII:SQ cDNA, hvilket lager vektoren pKGE432. Den siste vektoren ble fordøyet med KnpI og ApaI og det korresponderende 1700 basepar KpnI-ApaI fragmentet som koder for Leu 587 til Ala 2047 i faktor VIII:SQ proteinet, ble bundet til det store fragmentet av vektoren pKGE347 som hadde blitt spaltet med KpnI

og ApaI. Vektoren pKGE347, som var basert på *E.coli* kloningsvektor pBR327, består av den humane cytomegalovirus enhancer/promoter som er kodet på et 741 basepar DNA-segment (nukleotidposisjonene -671 til +71, Boshart, M. et al. (1985) Cell 41, 521-530), oppstrøms for faktor VIII:QD cDNA med SV40 t-antigenintronet og polyadenyleringssekvensen i den 3'-tilstøtende del. Den resulterende vektoren (pKGE436) som er avbildet i Figur 2, inneholder det komplette faktor VIII:SQ cDNA og er identisk til pKGE347 bortsett fra det forskjellige delesjonsderivat av faktor VIII som det koder for.

Eksempel 2

Transfeksjon av kinesiske hamsterovarieceller

I en 10 cm diameter cellekulturskål, ble 0,5 millioner dihydrofolatreduktase-manglende kinesiske hamsterovarieceller (CHO-DG44, oppnådd fra Dr. L.A. Chasin, Columbia Universitet, New York), sådd i Dulbecco's Modifiserte Eagles Medkum/Ham's F12 (1:1) supplert med 10% føtalt kalveserum og inkubert over natten ved 37°C i en 5% karbondioksyd-inkubator. Den neste dag ble cellene vasket over friskt medium og deretter transfektert ved hjelp av kalsiumfosfat-fremgangsmåten med 10 µg av en 1:1 blanding av faktor VIII:SQ produksjonsvektor pKGE436 og dihydrofolat-reduktasevektoren pKGE327 ifølge fremgangsmåtene i feltet. Vektoren pKGE327 inneholder en transkripsjonsenhet som består av de musemamma-tumorvirus lange terminale repeterte oppstrøms sekvens av muse-dihydrofolat reduktase cDNA med SV40 t-antigen og polyadenyeringssekvens ved 3'-nære del klonet inn i vektoren pML2 i retning med klokken (Figur 3). På dag 3 ble mediet fjernet, cellene vasket og spaltet i nye celledyrkningsskåler. På dag 4 ble seleksjonen for dihydrofolat-reduktase-positive celler startet ved å erstatte mediet med de ovenfor nevnte celledyrkningsmedium som mangler hypoksantin, glycin og thymidin og supplert med 10% gjennom-dialysert føtalt kalveserum. Medium ble byttet to ganger i uken, og etter omtrent 2 uker kunne dihydrofolat-reduktase positive cellekolonier bli høstet. Disse koloniene ble videre dyrket i 25 cm^2 cellekulturflasker, og etter at de hadde nådd nesten full tetthet

(konfluens), ble mediet erstattet med friskt medium som inneholdt 3% føtalt kalveserum. Etter en periode på 24 timer, ble aktiviteten til faktor VIII:C i kulturmediet testet ved bruk av den syntetiske substratmetoden (Coatest faktor VIII:C, KABI). Resultatene er vist nedenfor i Tabell 1.

TABELL 1

CHO-DG44 cellelinjer som lager FVIII SQ

Celle-linje nr.	Coatest-metode mU/ml)	Celle-linje nr.	Coatest-metode (mU/ml)
208:1	10	208:13	107
2	73	14	167
3	147	15	253
4	27	16	253
5	107	17	313
6	80	18	307
7	73	19	27
8	87	20	287
9	93	21	393
10	33	22	467
11	47	23	107
12	147	24	180

Genforsterkning av CHO-DG44 cellelinjer som produserer faktor VIII:SQ

CHO-DG44 cellelinjen 208:22 i tabell 1 som produserer 467 mU/ml/dag faktor VIII:SQ ble valgt for videre genforsterkning ved seleksjon og vekst i metotreksat. Etter flere uker med kultur i 20 nM metotreksat, ga cellelinjen 208:22 opphav til flere nye resistente cellekloner. Disse klonene ble dyrket individuelt og ført videre som atskilte kulturer som beskrevet ovenfor. Produksjonen av faktor VIII:C i mediet til disse klonene ble målt som eksempel 1. Resultatet er vist i tabell 2.

TABELL 2

Forsterkede cellelinjer som lager faktor VIII:SQ som stammer fra CHO-DG44 cellelinjen 208:22

Celle-linje nr.	Coatest-metode (mU/ml)	Cellelinje nr.	Coatest-metode (mU/ml)
208:22:1	1040	208:22:13	1070
2	690	14	860
3	660	15	930
4	720	16	680
5	800	17	790
6	940	18	750
7	1100	19	960
8	260	20	80
9	900	21	1130
10	660	22	920
11	720	23	950
12	870	24	1010

Eksempel 3

Rensing og biokjemisk karakterisering av faktor VIII:SQ

Faktor VIII:SQ laget av den forsterkede CHO-DG44 cellelinjen 208:22 ble undersøkt for biokjemiske karakteristika. En delvis opprensning av faktor VIII materialet fra kulturmediet ble utført før studiet. Dette omfattet et immunaffinitetskromatografi-trinn med bruk av et underlag (matrix) som inne-holdt monoklonale antistoffer rettet mot faktor VIII, etterfulgt av et ionebyttekromatografitrinn. Den spesifikke aktiviteten av det rensede faktor VIII-materialet som ble oppnådd var i området 3.000-4.000 IU/A_{280} og forholdet faktor VIII-aktivitet/-faktor VIII antigen var nær til 1 (aktivitet ble mål med Coatest (KABI), og antigen bestemt ved ELISA-metode med bruk av monoklonale antistoffer rettet mot 80 kD-kjeden). Det rensede faktor VIII:SQ materialet ble undersøkt med SDS-polyakrylamid-gelelektroforese (DSD-PAGE) og Western blot-analyse. SDS-PAGE ble utført ifølge Laemmli (1970) Nature 227, 680-685. Kanin polyklonalt anti-human faktor VIII antistoffer ble benyttet for Western blot-analyse, og analysen var i det vesentlige utført som beskrevet av Towbin, H. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354). Resultatene oppnådd

er vist i Figur 4, Spor 1: plasma faktor VIII som inneholdt en 80 kD lett-kjede og tunge kjeder som varierer fra 200 kD til 90 kD. Sporene 2 og 3: rekombinant faktor VIII:SQ som inneholder en 90 kD kjede og en 90 kD kjede. Materialene som stammer fra 2 forskjellige blandinger av faktor VIII:SQ renset som beskrevet ovenfor. Analysen viste således nærvær av 2 hovedbånd i faktor VIII:SQ-materialet, et ved 90 kD og et dobbeltbånd ved 80 kD. De to båndene ble funnet i den samme posisjon på gelen som 90 kDa og 80 kDa peptidene som representerer det minste biologiske aktive kompleks av plasma faktor VIII. En mindre mengde av 170 kDa bånd (< 5% av det totale materialet) ble funnet i faktor VIII:SQ-materialet, sannsynligvis representerte dette ikke-spaltet, primært translasjonsprodukt. Videre, indikerte N-terminal sekvensbestemmelse med automatisk Edman degradering av faktor VIII:SQ proteinet, at N-terminus av 90 kDa og 80 kDa kjedene er identiske med de til plasmaavledet 90 kDa pluss 80 kDa faktor VIII. Dette resultatet viste således at *in vivo* spaltningsprosessen til det primære translasjonsproduktet i to polypeptidkjeder hadde vært effektive.

Faktor VIII:SQ kunne aktiveres ved humant trombin på en doseavhengig måte. Inaktiveringen ble deretter fulgt. I Figur 5 er kurven for aktivitetsforandringer vist når 0,1 U trombin pr. 1 IU renset faktor VIII:SQ ble tilsatt. Ett-trinns koagulasjonsfremgangsmåte (Mikaelsson, M. et al. (1983) Blood 62, 1006-1015) ble benyttet for straksmåling av prøver i reaksjonsblandingen. En 15-ganger aktivering ble oppnådd innen 1 minutt, som så ble etterfulgt av inaktivering. Sodiumdodecyl-sulfat ved 0,02 g/ml ble tilsatt for å stoppe reaksjonen i prøvene før analyse. SDS-polyakrylamid gelelektroforese og Western blot-analyse med kanin polyklonale antistoffer mot human faktor VIII ble utført på prøver som ble tatt ut på forskjellige tidsintervaller under reaksjonen (Figur 6). Elektroforese og immunblot ble utført som beskrevet i relasjon til Figur 4.

Resultatene som ble oppnådd viste en molekylforandring av faktor VIII peptider som var identiske til den for faktor VIII under inkubasjon med trombin. Således ble 90 kD peptidet spaltet av trombin og i 50 kDa plus et 40 kDa peptid ble dannet.

80 kD peptidet ble spaltet og et 70 kD peptid ble dannet. Det svake båndet sett ved 170 kDa i faktor VIII:SQ prøven forsvant under det første minuttet med inkubering med trombin, og peptidene ble tilsynelatende laget identiske til de som ble laget fra 90 kDa-80kDa-komplekset. Studiene med trombin viste at faktor VIII:SQ oppfører seg som plasma faktor VIII i reaksjonen med dette enzymet. Denne egenskapen anses å være vesentlig for biologisk aktivitet *in vivo*.

Reaksjonen mellom faktor VIII:SQ med human von Willebrand faktor ble studert ved bruk av størrelses-eksklusjonskromatografi på Sepharose CL-6B. Ti (10) IU faktor VIII:SQ ble inkubert med 30 U renset human von Willebrand faktor ved 37°C i 20 minutter. Inkubasjonsblandingen ble så påsatt en søyle pakket med Sepharose CL-6B. Alt materialet med faktor VIII aktivitet eluerte i void-volumet med von Willebrand faktor. Når faktor VIII:SQ som ikke hadde noe tilsatt von Willebrand faktor ble satt på søylen, eluerte materialet med faktor VIII aktivitet bare i de siste fraksjonene i en posisjon hvor også 90 kD-80 kD formen av plasma faktor VIII eluerte. Dette resultatet viser at faktor VIII:SQ har evnen til å binde von Willebrand faktor, som er en egenskap nødvendig for god *in vivo* overlevelse. (Brinkhous, K.M. et al. (1985) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 82, 8752-8756).

Faktor VIII:SQ DNA i den foreliggende oppfinnelse er blitt deponert hos Tyske Samling av Mikroorganismer og Cellekulturer den 13. desember 1989 og er gitt deponeringsnr. DSM 5693.

P a t e n t k r a v

1. DNA-sekvens som koder for et biologisk aktiv rekombinant human faktor VIII-derivat som omfatter to polypeptidkjeder på henholdsvis 90 kDa og 80 kDa, idet nevnte DNA sekvens er istand til å uttrykke i en egnet vertscelle og utskille nevnte derivat fra cellen, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et første DNA-segment som koder for 90 kDa-kjeden til human faktor VIII og et annet DNA-segment som koder for 80 kDa-kjeden til humant faktor VIII, idet nevnte segmenter er bundet sammen av et mellomliggende (linker) DNA-segment som koder for et mellompeptid på opp til 20 aminosyrerester av B-området i human faktor VIII, idet minst 4 av nevnte aminosyrerester stammer fra den C-terminale del av nevnte område.

2. DNA-sekvens ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte DNA-mellomsekvens koder for en aminosyresekvens som omfatter 12 aminosyrer som stammer fra B-området i human faktor VIII.

3. DNA-sekvens ifølge ett av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte DNA-mellomsekvens koder for minst 7 aminosyrerester i B-området i human faktor VIII, minst 4 aminosyrerester som stammer fra den C-terminale og minst 2 aminosyrerester som stammer fra den N-terminale del av nevnte område.

4. DNA-sekvens ifølge ett av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte DNA-mellomsekvens koder for 12 aminosyrerester som stammer fra den C-terminale, og 2 aminosyrerester som stammer den N-terminale del av B-området i human faktor VIII.

5. Rekombinant ekspresjonsvektor som inneholder en transkripsjonsenhet, k a r a k t e r i s e r t v e d DNA-sekvensen ifølge et av kravene 1-4, en promoter og en polyadenyleringssignalsekvens, og som er i stand til å uttrykke det gitte genet.

6. Vertscelle av dyreopprinnelse k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med rekombinant ekspresjonsvektor ifølge krav 5.

7. Fremgangsmåte ved fremstilling av et biologisk aktivt rekombinant human faktor VIII-derivat uttrykt ved hjelp av en DNA-sekvens ifølge ett av kravene 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d dyrking av en dyrecellelinje som er transformert med en rekombinant ekspresjonsvektor ifølge krav 5 i et næringsmedium som tillater ekspresjon og sekresjon av human faktor VIII-derivat bestående av 2 polypeptider med molekylvekter på henholdsvis 90 kDa og 80 kDa, bundet til hverandre ved hjelp av en metallionebro, og isolering av nevnte derivat fra kulturmediet.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av human faktor VIII-derivat ifølge krav 7 som består av 90 kDa-polypeptidkjeden av human faktor VIII og 80 kDa-polypeptidkjeden av human faktor VIII hvor kjedene er bundet sammen ved en metallionebro og hvor 90 kDa-polypeptidkjeden inneholder et linkerpeptid på opp til 20 aminosyrerester av B-området av human faktor VIII, idet minst 4 av nevnte aminosyrerester stammer fra den C-terminale del av nevnte område k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende ekspresjonssystem anvendes.

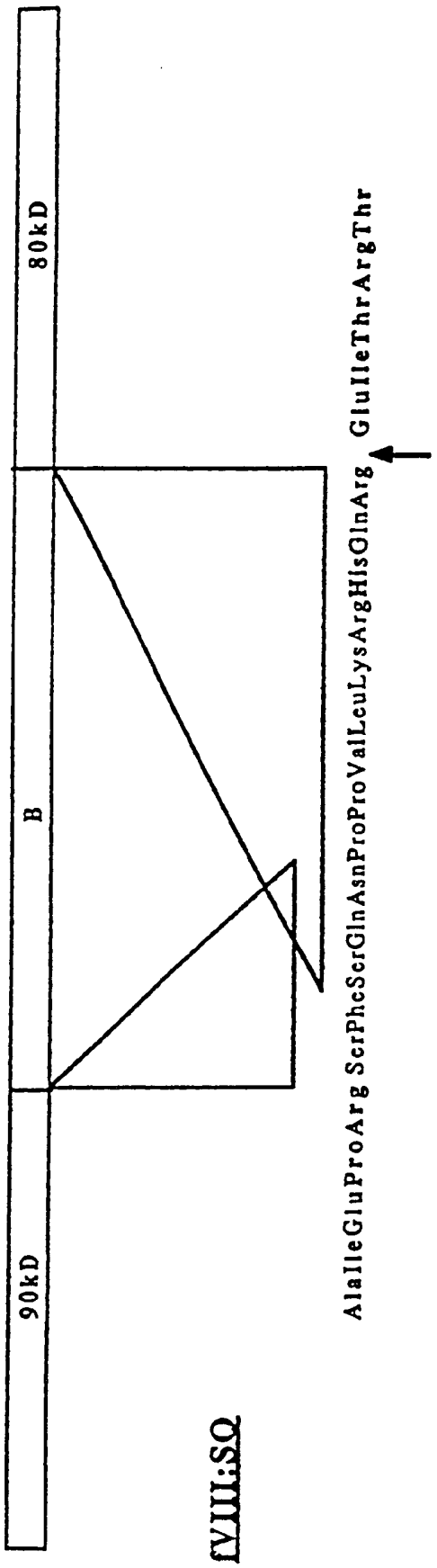

80kD
B
90kD
fVIII:SQ
AlaIleGluProArg SerPheSerGlnAsnProProValLeuLysArgHisGlnArg GluIleThrArgThr

FIG.1

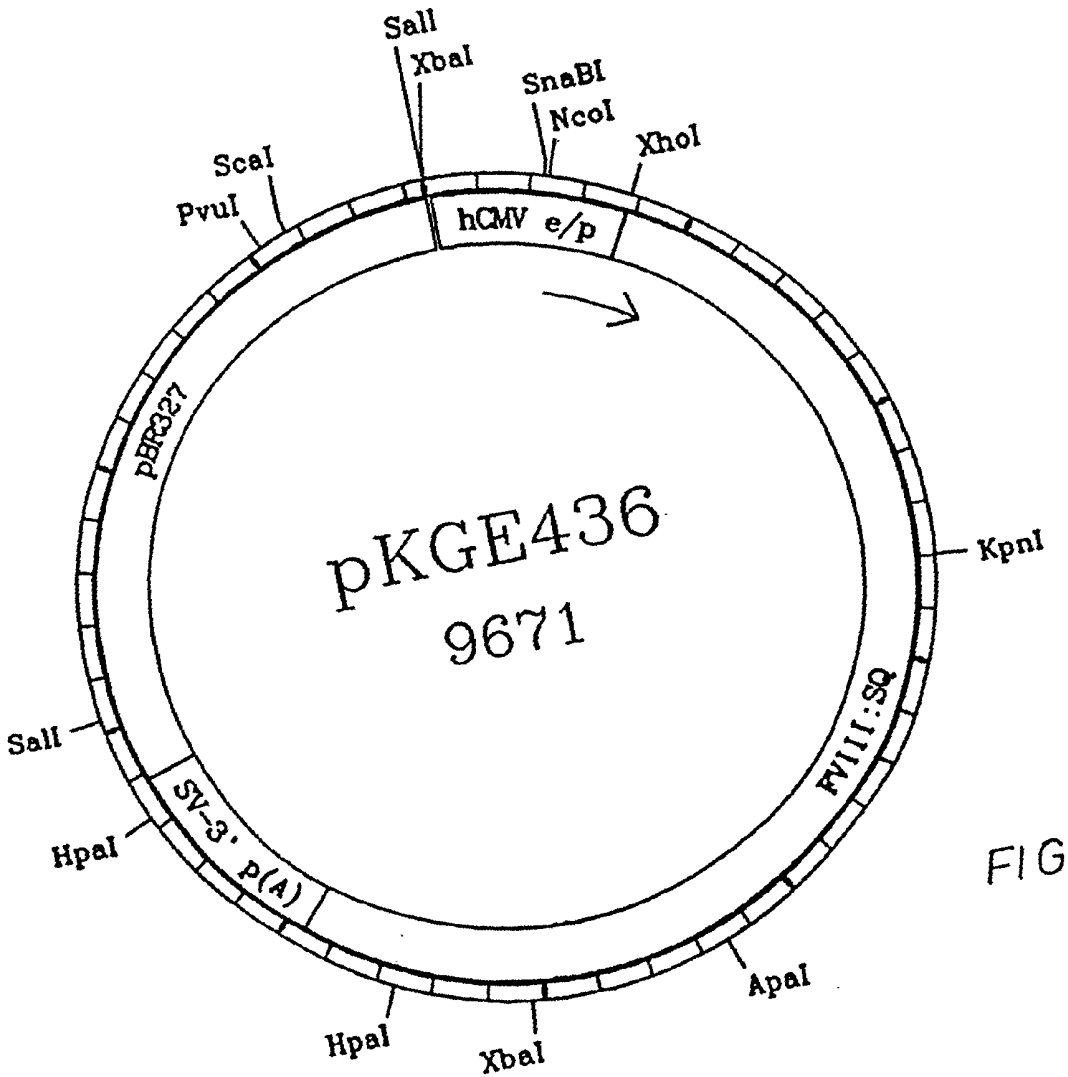

SalI
XbaI
SnaBI
NcoI
XhoI
ScaI
PvuI
hCMV e/p
pBR327
pKGE436
9671
KpnI
FVIII:SQ
SalI
SV-3' P(A)
HpaI
HpaI
XbaI
ApaI

FIG. 2

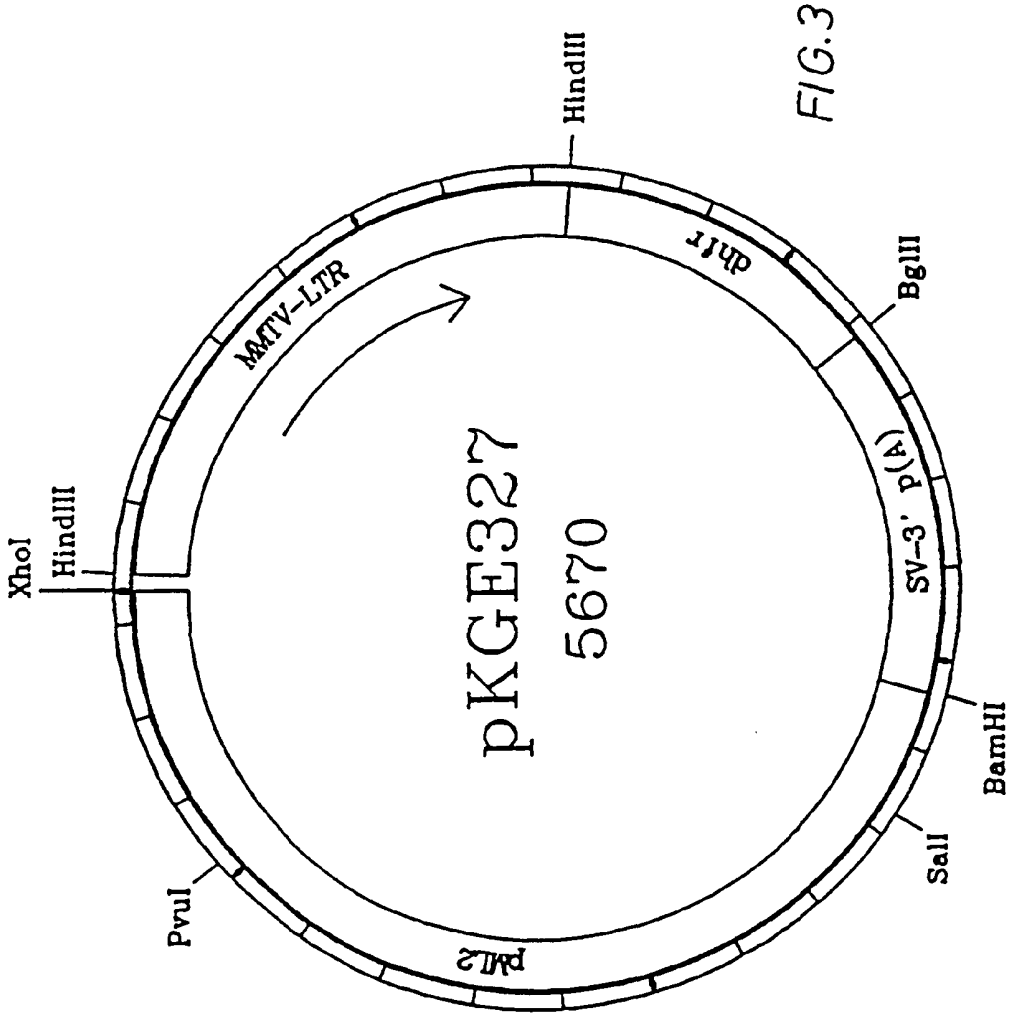

pKGE327
5670
HindIII
BglII
BamHI
SalI
PvuI
XhoI
HindIII
MMTV-LTR
dhfr
SV-3' p(A)
pML2

FIG.3

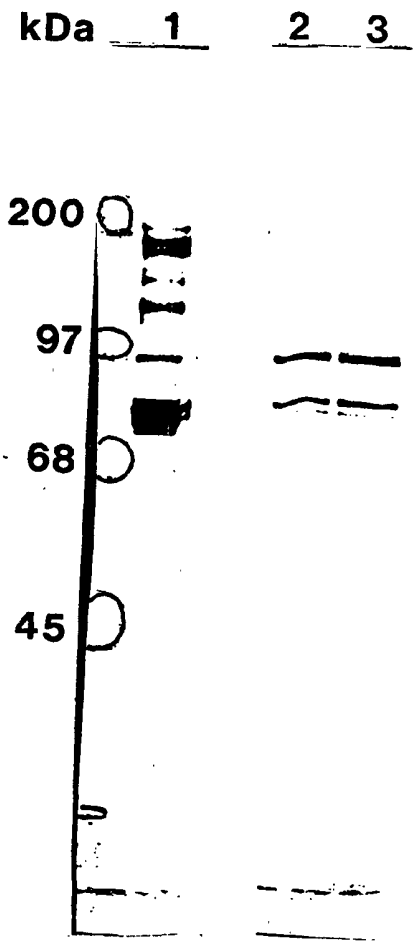


FIG. 4

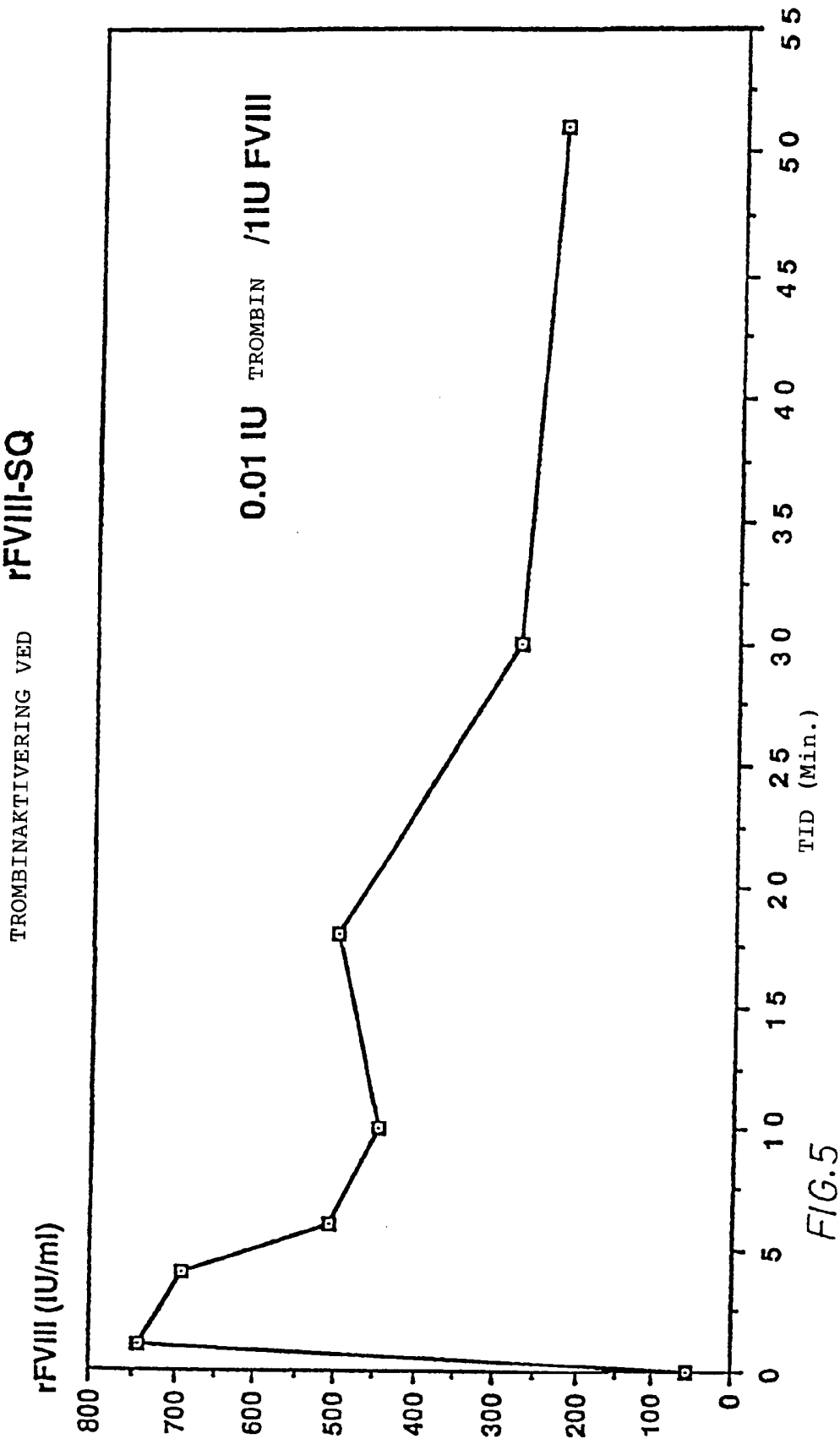

TROMBINAKTIVERING VED rFVIII-SQ
0.01 IU TROMBIN /1IU FVIII
rFVIII (IU/ml)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
TID (Min.)

FIG.5

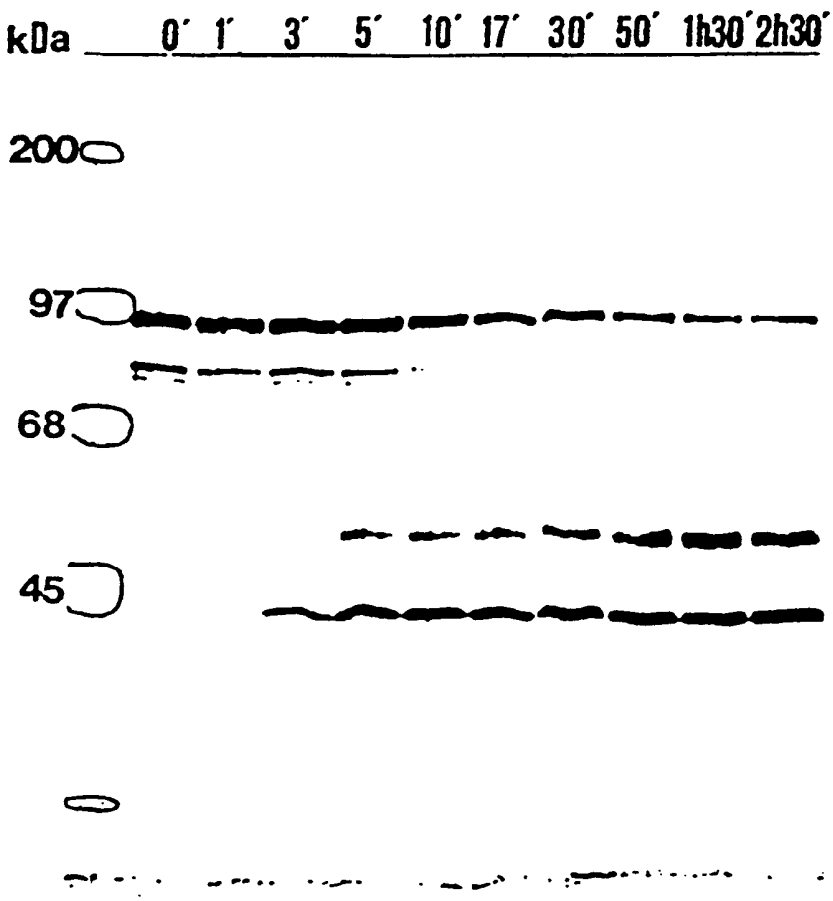


FIG.6