



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 300217

(13) B1

(51) Int Cl<sup>6</sup> C 07 K 1/16, 1/36

## Patentstyret

(21) Søknadsnr	900185	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	12.05.89, PCT/US89/02057
(22) Inng. dag	12.01.90	(85) Videreføringsdag	12.01.90
(24) Løpedag	12.05.89	(30) Prioritet	13.05.88, US, 193857
(41) Alm. tilgj.	12.03.90		09.05.89, US, 348011
(45) Meddelt dato	28.04.97		

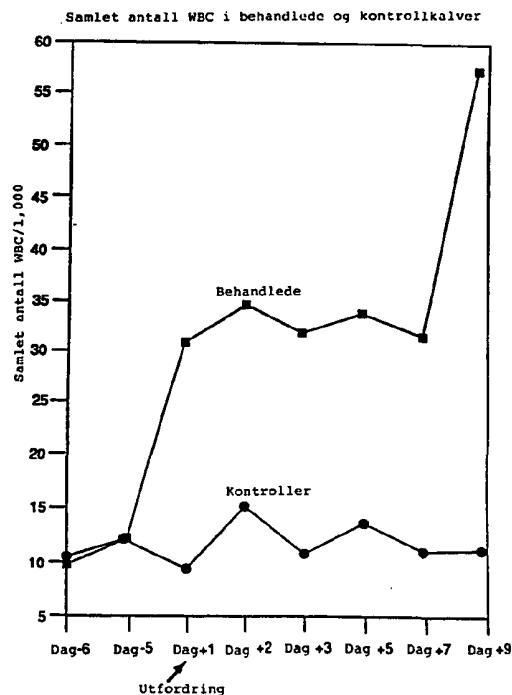
(73) Patenthaver	Amgen Inc, 1900 Oak Terrace Lane, Thousand Oaks, CA 91320, US
(72) Oppfinner	Thomas C. Boone, Newbury Park, CA, US Allan L. Miller, Glendale, CA, US Jeffrey W. Andresen, Ventura, CA, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 OSLO

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for isolering og rensing av bovin eller human G-CSF fra en mikroorganisme som produserer bovin eller human G-CSF

(56) **Anførte publikasjoner** Infection and Immunity, Vol 55 (11), 1987, pp 2715-2720  
Methods in Enzymology, Vol 116, 1985, pp 600-619  
The EMBO Journal, Vol 5, 1986, pp 575-581  
Biological Chemistry Hoppe-Seyley's Z. Physiological Chemie, Vol 363, 1982, pp 1493-1500  
M. Tsuchya et al, Proc. Natl. Acad. Sci, Vol 83, pp 7633-7637, Oct. 1986  
C.R. Maliszewski et al, Molecular Immunology, Vol 25, No 9, pp 843-850, 1988

(57) **Sammendrag**

Preparater og fremgangsmåte for behandling eller forhindring av bakterieinfeksjoner, slik som jurbetennelse hos dyr, særlig bovine dyr, som omfatter administrering av en effektiv mengde granulocytstимуlerende faktor (G-CSF). G-CSF kan være naturlig utvunnet, eller alternativt kan G-CSF og genetisk konstruerte varianter av G-CSF være ekspresjonsproduktene av genetisk konstruerte prokaryote eller eukaryote vertceller.



### Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot fremgangsmåte for isolering og rensing av bovin eller human G-CSF fra en mikroorganisme som produserer bovin eller human G-CSF. Human G-CSF (hG-CSF) eller bovin G-CSF (bG-CSF) kan anvendes ved behandling eller forhindring av infeksjoner hos dyr. Kilden for G-CSF kan være utvunnet naturlig eller kan være utvunnet fra genetisk konstruerte prokaryote eller eukaryote vertceller som inneholder rekombinante plasmid- eller virus-DNA-vektorer som bærer det humane eller bovine G-CSF-gen, eller genetisk konstruerte varianter av humane eller bovine G-CSF-gener, eller syntetiske humane eller bovine G-CSF-gener.

### Oppfinnelsens bakgrunn

Infeksjoner hos dyr resulterer i tap av milliarder av dollar pr. år i kjøtt- og meieriindustrien. Selv om behandling med antibiotika nå anvendes for dyreinfeksjoner med et visst hell, er det fortsatt enorme tap. Eksempler på slike infeksjoner er jurbetennelse hos kuer og transportfeber hos kveg.

### Bovine dyr

#### A. Jurbetennelse

Det mest kostbare problem innen melkeproduksjonen i dag er jurbetennelse. Jurbetennelse defineres som en inflammasjon i melkekjertelen. Den kan angripe ethvert pattedyr, f.eks. kuer, søyer og geiter, men bovin jurbetennelse har den største økonomiske betydning. Bovin jurbetennelse er en infeksjon i juret hos slike drøvtyggere som kuer,

hovedsakelig forårsaket av gram-positive og gram-negative bakterier, og spesielt hos kuer i intensivt melkeproduserende enheter. Bakterieinfeksjonen resulterer i betennelsen i melkekjertelen (dvs. spener og jur). Sykdommen er særlig brysom og av betydelig økonomisk viktighet på grunn av at den patogene organisme lett overføres fra ett dyr til et annet under melkeprosessen. Noen av de viktigste patogene mikroorganismer som forårsaker bovin jurbetennelse, er Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae, Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae og Pseudomonas aeruginosa. Se også Bovine Mastitis, red. av Glenys Bloomfield, V&O Publications 1987. Disse mikroorganismene invaderer juret gjennom spenekanalen og gir betennelse i det melkeproduserende vev, noe som forårsaker dannelsen av arrvev som, når det først er dannet, kan forårsake en permanent reduksjon i kuens melkeproduksjon. En infeksjon kan også endre sammensetningen, mengden, utseendet og kvaliteten av melken.

Det er også flere forskjellige former eller typer av bovin jurbetennelse med varierende alvorlighet og symptomatologi, inkludert de følgende:

(1) Jurinfeksjon: Invasjonen i jurhulen av mikroorganismer som formerer seg i kjertelen og forårsaker betennelse.

(2) Ikke-klinisk eller subklinisk jurbetennelse: En form for jurbetennelse hvor det ikke er noen svelling av kjertelen eller noe unormalt med melken, selv om det er endringer i melken som kan påvises ved hjelp av spesielle tester. Denne type jurbetennelse er langt den mest fremtredende og forårsaker de største totale tap i de fleste buskaper. Den henvises ofte til som "skjult" jurbetennelse.

(3) Klinisk jurbetennelse: En form for jurbetennelse hvor de unormale tilstander i juret og sekresjonen er observerbare. Mild klinisk jurbetennelse omfatter endringer i melken, slik som flak, klumper og et vannaktig eller uvanlig utseende. Varme og følsomhet i juret er svak eller

• fraværende, men det kan være et tegn på svelling. Alvorlig klinisk jurbetennelse omfatter en plutselig inntreden med svelling av den infiserte fjerdedel som er varm, hard og ømfintlig. Melken synes unormal, og melkeproduksjonen faller.  
5 I tillegg til de lokale effektene i juret blir kuen selv noen ganger syk. Det er tegn på feber, hurtig puls, depresjon, svakhet og tap av appetitt. Kombinasjonen av disse tilstandene henvises ofte til som akutt systemisk jurbetennelse på grunn av at ikke bare juret, men hele dyret er smittet.

10 (4) Kronisk jurbetennelse: En form for jurbetennelse forårsaket av en vedvarende jurinfeksjon som foreligger mesteparten av tiden i den ikke-kliniske form, men som av og til kan utvikle seg til en aktiv klinisk form. Etter disse plutselige oppblussinger vender den ikke-kliniske form vanligvis midlertidig tilbake. (Se generelt Current Concepts of Bovine Mastitis, utgitt av The National Mastitis Council, Inc., 2. utg., 1978, s. 5).

Jurbetennelse fortsetter å forårsake store økonomiske tap for meieriindustrien. Jurbetennelse påvirker lønnsomheten ved en buskap på flere måter, både direkte og indirekte,  
20 deriblant: (1) tap av melkeproduksjon; (2) større frasortering av infiserte kuer, (3) redusert melkeverdi, (4) kassert melk etter antibiotikabehandling, (5) veterinærkostnader (antibiotika og veterinærbesøk) og (6) dødsfall. (Bovine  
25 Mastitis, Glenys Bloomfield, supra, s. 33). En beregning av den årlige kostnad i USA er 1 milliard dollar bare for melk. Behandlings- og utsorteringskostnader øker dette overslaget av total kostnader til ca. 1,5 - 2 milliarder dollar pr. år i USA, og dette utgjør effekten av jurbetennelse på bare 5%  
30 av verdens melkekupopulasjon (Current Concepts of Bovine Mastitis, supra, s. 7). Selv om tallene for hele verden er løst anslått, avslører projiseringer fra U.S.D.A.-tall et tapstall for hele verden som overskrider 20 milliarder dollar årlig.

35 Effektive forbindelser for anvendelse ved behandlingen eller forhindringen av bovin jurbetennelse burde gi de følgende resultater: (1) de fleste eller alle de ovenfor angitte

• patogener burde være ømfintlige overfor forbindelsen når den patogene organisme er i melk og andre jurvæsker, (2) den terapeutiske effekt burde være forholdsvis hurtig, (3) ingen betydelig irritasjon burde bli forårsaket i spenene eller juret til kuen, hverken av den aktive eller andre bestanddeler i preparatet, og (4) den aktive forbindelse burde ikke forbli i melken over et tidsrom som er særlig lengre enn den tiden som er påkrevet for den terapeutiske aktivitet, for å minimalisere tapet av melk som må kasseres så lenge som en fremmed forbindelse er til stede. Det er andre krav til et slikt preparat for behandlingen av bovin jurbetennelse, men de ovenfor fire kriterier er noen av de mest viktige.

Antibiotikabehandling er blitt en hovedbestanddel i strategien for kontroll av jurbetennelse. Tabell 1 oppsummerer et antall antibiotika som brukes ved behandlingen av jurbetennelse:

20

25

30

35

Tabell 1  
Antibakterielle midler brukt ved  
behandlingen av jurbetennelse

5	Klasse	Forbindelser
	1. <u>Beta-lactam-antibiotika</u>	
	Penicilliner	Ampicillin Cloxacillin Hetacillin Nafcillin Penicillin G (benzyl-penicillin) Procain-penicillin
10		
15	Cefalosporiner	Cefoperazon ** Cefuroxim * Cefalonium * Cefapirin Cefoxazol * Cefracetril *
20		
	2. <u>Aminoglycosid-antibiotika</u>	Framycetin Neomycin Novobiocin Streptomycin
25		
	3. <u>Makrolid-antibiotika</u>	Erythromycin
	4. <u>Tetracykliner</u>	Klortetracyklin Oxytetracyklin
30		
	5. <u>Polypeptid-antibiotika</u>	Polymyxin B

\* Første generasjon,   \*\* tredje generasjon

35 Bovine Mastitis, supra, s. 70.

Antibiotikabehandling for jurbetennelse gis vanligvis ved hjelp av innsprøytinger i melkekjertelen, enten i lakterende kuer når klinisk jurbetennelse er påvist, eller når de begynner å tørke inn ("tørr ku"-terapi). (Bovine Mastitis, supra, s. 69). I tilfeller hvor alvorlig klinisk sykdom er til stede, må antibiotika gis parenteralt (innsprøytinger i melkekjertelen er ineffektive på grunn av blokkering av kanalene). (Ibid.).

De første håp om at antibiotika ville muliggjøre fullstendig kontroll av sykdommen, er ikke blitt virkeliggjort. Ingen av de ovenfor nevnte antibiotika som har vært benyttet hittil, har vært helt tilfredsstillende. I tillegg er det funnet å være svært ønskelig å erstatte antibiotikabehandling med behandling ved hjelp av ikke-antibiotiske kjemoterapeutiske legemiddelforbindelser av de følgende grunner:

(1) Antibiotika som er effektive i humanmedisin, bør ikke benyttes i veterinærmedisin for ikke å bygge opp stamme-resistens hos bakterier som forekommer ved sykdommer hos mennesket.

(2) Antibiotika bør reserveres for slike sykdommer som ingen kjemoterapeutisk legemiddelforbindelse vil være tilgjengelig for, ettersom det er blitt bevist at bakteriestammer bygger opp motstandskraft mot et antibiotikum etter langvarig bruk av slikt antibiotikum.

(3) Staphylococcus aureus, en av de ovenfor nevnte patogene organismer, har allerede bygget opp en motstandskraft mot de fleste antibiotika som benyttes ved behandlingen av bovin jurbetennelse.

En slik fremgangsmåte for behandling ved hjelp av en ikke-antibiotisk kjemoterapeutisk legemiddelforbindelse er beskrevet i US patentskrift nr. 4.610.993 hvor det er krevet en fremgangsmåte for behandling av dyr for bovin jurbetennelse med en effektiv mengde av minst én pyridin-N-oxyd-disulfidforbindelse. En annen fremgangsmåte er beskrevet i US patentskrift nr. 4.401.666 hvor det kreves en fremgangsmåte for behandling av dyr for bovin jurbetennelse

med en effektiv mengde av minst ett metallsalt av pyridin-2-thion-N-oxyd.

Til tross for disse flere publiserte fremgangsmåter forblir det svært viktig å finne kostnadseffektive metoder hvor det benyttes ikke-antibiotiske forbindelser som i vesentlig grad vil overvinne ulempene ved antibiotika som hittil har vært brukt, og likevel vil være effektive ved behandling og forhindring av jurbetennelse.

#### B. Transportfeber

En annen vanlig sykdom som påvirker kvegindustrien, er transportfeber (bovin luftveissykdom). Luftveissykdommer fortsetter å være hovedårsaken til sykdomstap blant kjøttkveg. I en årelang undersøkelse av sykdommer hos 407.000 års-kveg på oppføring var sykdommer i luftveiskanalen ansvarlig for ca. 3/4 av de kliniske diagnoser og ca. 2/3 av obduksjonsdiagnosene.

Uttrykket "transportfeber" brukes til å beskrive luftveissykdomskomplekset som iakttas hos 6 måneder gammelt kveg eller eldre etter transport enten til fôringssteder eller ut på beite. Påkjønningene ved avvenning, kastrering, fjerning av horn, fasting, overfylling, eksponering mot infektiose midler, diettendringer, ekstreme omgivelsestemperaturer og andre stressfaktorer kombinert med virus-, bakterie-, mycoplasma- og/eller chlamydia-infeksjoner bidrar til transportfeberkomplekset. Blanding av kalver fra forskjellige gårdsbruk og/eller salgsfjøs letter i stor grad eksponering mot infektiose midler. Populasjonsblanding kan være en viktigere predisponerende faktor for transportfeber enn stressfaktorer, selv om sykdom kan oppstå uten blanding og stressfaktorer vanligvis forverrer luftveissykdommen dramatisk. Forsøk på å redusere stress ved avvenning, kastrering, hornfjerning, etc., og tilvenning av kveg til nye dietter dager eller uker før transport er noen ganger vellykkede (men behøver ikke å være kostnadseffektive) når det gjelder å redusere hyppigheten av transportfeber.

- Vaksinasjon mot noen av de infektive midler som er involvert i transportfeber, er noen ganger nyttig, men vaksiner er tilgjengelige og virkningsfulle bare mot noen få av midlene som er kjent for å være involvert i sykdomskomplekset.

5 Det er generelt anerkjent at den egentlige dødsårsak i de fleste tilfeller av transportfeber er en bakteriell lungebetennelse (vanligvis Pasteurella). Pasteurella haemolytica, særlig type 1A, er den vanligste bakterie isolert fra tilfeller av luftveissykdom i Nord-Amerika. Forsøk på  
10 eksperimentelt å reprodusere bakteriell lungebetennelse hos kveg er vanligvis mislykket uten alvorlig stress og predisponerende skade på luftveiskanalen. Det antas generelt at under perioder med stress gir virus, mycoplasma og/eller chlamydia oftest den første skade på luftveiskanalen som  
15 predisponerer for alvorlig bakteriell infeksjon og sykdom.

Et typisk utbrudd av klinisk luftveissykdom begynner vanligvis innen timer eller dager etter kvegets ankomst til fôringsstedet. Nylig transportert kveg i vektområdet 136 - 227 kg har vanligvis en sykkelighet på 20 - 80% og dødelighet på 1 - 10%, eller mer, når det gjelder sykdom i  
20 luftveiene. Når serumet fra kveg analyseres for en firegangers antistofføkning (serumomdannelse) og luftveien og sekresjonene der underkastes mikrobiologiske isoleringer, kan et stort antall etiologiske midler identifiseres. Mange  
25 dyr, både syke og tilsynelatende friske, kan påvises å ha gjennomgått infeksjon med ett eller flere midler (sykdom i luftveiene er sannsynligvis sjelden på grunn av bare ett infektivt middel). Selv om bovint luftveissykdomskompleks er klinisk erkjent på fôringsstedet etter ankomst, starter  
30 infeksjonene som gir opphav til klinisk sykdom, sannsynligvis i salgsfjøsene hvor kveg først samles fra forskjellige gårdsbruk. Se også Bovine Respiratory Disease, Loan, R. W. Texas A & M University Press, 1984.

### 35 Porcine dyr

Luftveissykdommer, særlig lungebetennelse, koster griseindustrien hundretalls av millioner dollar årlig. Det

er problem nr. 1 i vekst/klargjørings-perioden som utgjør halvparten av grisens liv. Noen av de vanlige patogener som er involvert i forbindelse med lungebetennelse, er *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumonia*, *Haemophilus* (5) (*Activobacillus*) *pleuropneumonia*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholersuis*, *Bordetella bronchiseptica*, pseudo-rabies-virus og svineinfluensavirus.

*Haemophilus Actinobacillus pleuropneumoniae* er en hovedårsak for lungebetennelse hos griser. Sykdommen er (10) spredd over hele verden og er en av de økonomisk viktigste svinesykdommer. I 1985 ble luftveissykdommer hos griser beregnet til å ha resultert i et tap for produsentene på 208 millioner dollar. *Pleuropneumonia* er den mest fryktede luftveissykdom på grunn av at vaksiner ikke forhindrer (15) infeksjoner eller ikke forhindrer fremkomsten av vedvarende infiserte bærerdyr.

Den økonomiske innvirkning av et akutt utbrudd av *pleuropneumonia* i en ueksponert buskap er åpenbar med dødstap som varierer fra 0,4 til 24% og hvor sykkeligheten er (20) mellom 8,5 og 40%. Behandling av den akutte sykdom har vært basert på bruken av antibiotika. Rutinebruken av antibiotika begrenses hurtig på grunn av bekymringer hos almenheten og press fra myndighetene.

Nærmere histomorfologiske og bakteriologiske undersøkelser av porcin *pleuropneumonia* avslører at i) tidlig (25) under sykdommen lokaliseres store antall neutrofiler på infeksjonsstedet, ii) det er et forhold mellom grisenes evne til å begrense infeksjonen til lungene og derved forhindre bakteriemi, og overlevelse, og iii) eksperimentell uttømming av neutrofiler i blodomløpet resulterer i en mer alvorlig (30) sykdom.

### Hester

De første to ukene av livet (neonatal periode) er en (35) tid da alvorlig sykdom eller dødstop oppstår hos føll på grunn av infeksjon (sårbetennelse). Neonatal sårbetennelse utgjør betydelige tap for hesteindustrien. Hos sårbetente føll

- er neutrofil tallet vanligvis svært lavt (neutropeni), og dette er en grunn til dødsfallraten på 60-75% med sårbetennelse hos nyfødte føll.

Problemer som er sekundære for gram-negativ sårbetennelse, slik som ben- og leddødeleggelse, enteritt, omfaloflebitt, sykdom i luftveiene og dårlig utvikling, gir også betydelige tap innen hesteindustrien. Immunglobulin-nivåer har ikke korrelert godt med beskyttelse mot infeksjon, idet 20% av føll med sårbetennelse har det doble av det anbefalte IgG-nivå (400 mg/dl). Selv med utsikt til intensiv pleie av kritisk syke, sårbetente føll er overlevelsesraten bare 25-40%. Neutrofil funksjon er blitt bestemt til å bli vesentlig redusert hos føll med tap av råmelk. Dette kombinert med den hyppige utvikling av neutropeni sammen med sårbetennelse hos det nyfødte føll er viktige grunner for den høye dødelighet og muligens for initieringen av infeksjon.

#### Granulocyttkolonistimulerende faktor

Granulocyttkolonistimulerende faktor (G-CSF) er en av flere glycoprotein-vekstfaktorer kjent som kolonistimulerende faktorer (CSF-er) på grunn av at de understøtter proliferasjonen av hemopoietiske forløperceller. G-CSF stimulerer proliferasjonen av spesifikke benmarg-forløperceller og deres differensiering til granulocytter. Den adskiller seg fra andre CSF-er ved evnen til både å stimulere neutrofil granulocyttkolonidannelse i halvfast agar, og til å indusere sluttdifferensiering av murine myelomonocytiske leukemiaceller in vitro. Granulocyttkolonistimulerende faktor er en sterk stimulans for neutrofil proliferasjon og modning in vivo (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1987, 84, s. 2484-2488). G-CSF er også i stand til å indusere funksjonell aktivering eller "priming" av fullt utviklede neutrofiler in vitro (Weisbart, R.H., Gasson, C.G. og D.W. Golde, Annals of Internal Medicine, 1989, 110, s. 297-303). G-CSF er blitt påvist å påvirke humane granulocytter og øke superoxydfrigjørelse stimulert ved hjelp av det kjemotaktiske

peptid, N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin (S. Kitagawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 144, s. 1143-1146, og C.F. Nathan, Blood, 1989, 74, s. 301-306), og aktivere human neutrofil IgA-mediert fagocytose (Weisbart, R.H. et al., Nature, 1988, 332, s. 647-649).

Neutrofiler er en avgjørende bestanddel i vertsforsvarsmekanismer mot bakterie- og soppinfeksjoner. G-CSF er i stand til å indusere en økning i det absolutte antall neutrofiler i blodomløpet og øke neutrofil funksjon.

cDNA-kloningen og -ekspressjonen av rekombinant human G-CSF er blitt beskrevet, og det er blitt bekreftet at den rekombinante G-CSF utviser de fleste, om ikke alle, av de biologiske egenskaper til det naturlig forekommende molekyl (Souza, L. et al., Science, 232, s. 61-65 (1986)).

Sekvensanalyse av cDNA- og genom-DNA-klonene har muliggjort utledningen av aminosyresekvensen og avslører at proteinet er 204 aminosyrer langt med en signalsekvens på 30 aminosyrer. Det fullt ferdige protein er 174 aminosyrer langt og har ingen potensielt N-bundne glycosylerings seter, men flere mulige seter for O-bundet glycosylering.

Kloningen og ekspressjonen av cDNA som koder for human G-CSF, er blitt beskrevet av to grupper (Nagata, S. et al., Nature, 319, s. 415-418 (1986) og Souza, L. M. et al., Science, 232, s. 61-65 (1986)). Den første rapport om en G-CSF-cDNA-klon foreslo at det fullt ferdige protein var 177 aminosyrer langt. Forfatterne rapporterte at de også hadde identifisert en cDNA-klon for G-CSF som kodet for et protein som manglet en strekning på tre aminosyrer. Denne kortere form av G-CSF-cDNA uttrykker den forventede G-CSF-aktivitet. Den andre rapporten beskriver en cDNA-sekvens som er identisk med denne korte form og nevner ikke andre varianter. Ettersom disse forfatterne bekreftet at den korte cDNA uttrykker G-CSF med den forventede profil med hensyn til biologisk aktivitet, er det sannsynlig at dette er den viktige form av G-CSF og at den lengre form er enten en mindre spleisevariant eller resultatet av en kloningsartefakt.

Matsumoto et al., i Infection and Immunity, vol. 55, nr. 11, s. 2715 (1987) omtaler den beskyttende effekt av human G-CSF på mikrobeinfeksjon hos neutropeniske mus.

De følgende patentpublikasjoner vedrører G-CSF:

5 WO-A-8703689, overdratt til Kirin/Amgen, beskriver hybridomer som produserer monoklonale antistoffer som er spesifikke for human G-CSF og deres anvendelse ved rensingen av G-CSF; WO-A-8702060, overdratt til Biogen, beskriver humane G-CSF-lignende polypeptider og fremgangsmåter for fremstilling  
10 ing av dem; US patentskrift nr. 4.810.643, overdratt til Amgen, beskriver humane G-CSF-lignende polypeptider, sekvenser som koder for dem og fremgangsmåter for fremstilling derav; og WO-A-8604605 og WO-A-8604506, begge overdratt til Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha, beskriver et gen som  
15 koder for human G-CSF og infeksjonsinhibitorer som inneholder human G-CSF.

Formålet ved oppfinnelsen er å tilveiebringe en fremgangsmåte for isolering og rensing av bovin eller human G-CSF fra en mikroorganisme som produserer bovin eller human G-CSF.

20

#### Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en fremgangsmåte for isolering og rensing av bovin eller human G-CSF fra en mikroorganisme som produserer bovin eller human  
25 G-CSF.

Fremgangsmåten er kjennetegnet ved at:

- 1) mikroorganismen lyseres, og uopløselig materiale som inneholder bovin eller human G-CSF, atskilles fra oppløselig proteinholdig materiale,
- 30 2) det humane G-CSF-materiale ekstraheres med deoxycholat,
- 3) den bovine eller humane G-CSF oppløseliggjøres og oxyderes i nærvær av et denaturerende, oppløseliggjørende middel og et oxydasjonsmiddel,
- 35 4) det denaturerende, oppløseliggjørende middel fjernes fra den bovine eller humane G-CSF,

5) den bovine G-CSF underkastes kationbytterkromatografi eller den humane G-CSF underkastes anionbytterkromatografi etterfulgt av kationbytterkromatografi, og

6) rensset bovin G-CSF utvinnes ved å eluere kationbytterkromatografikolonnen med en acetatbuffer som inneholder 125-175 mM natriumklorid ved en pH-verdi på ca. 5,4, eller human G-CSF utvinnes ved å eluere anionbytterkolonnen med en tris-buffer som inneholder 35-45 mM natriumklorid ved en pH-verdi på ca. 7,7, etterfulgt av eluering av kationbytterkolonnen med en acetatbuffer som inneholder 35-40 mM natriumklorid ved en pH-verdi på ca. 5,4.

#### Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser restriksjonskartet for bovin G-CSF.

Figur 2a illustrerer det kodende område til det fullt ferdige protein av bovin G-CSF.

Figur 2b er aminosyresekvensen til det fullt ferdige protein.

Figur 3 er genomsekvensen til human G-CSF.

Figur 4 er DNA-sekvensen til et første syntetisk gen for bovin G-CSF (bG-CSF-dna).

Figur 5 illustrerer oligoene som brukes til å konstruere underenhetene til et ytterligere syntetisk gen for bovin G-CSF (bG-CSF-dna4).

Figur 6 viser de to underenhetene til det syntetiske gen bG-CSF-dna4 for bovin G-CSF.

Figur 7 viser aminosyrene kodet for av det syntetiske gen bG-CSF-dna4 for bovin G-CSF.

Figurene 8-12 er grafiske fremstillinger av resultatene oppnådd i eksempel 4 som vedrører behandling av kuer smittet med *Pasteurella hemolytica*, med G-CSF.

Figurene 13-17 viser resultatene oppnådd i eksempel 5 som vedrører bruken av G-CSF til å kontrollere bovin luftveissykdom.

Figurene 18-20 viser resultater oppnådd i eksempel 6

som undersøker effekten av G-CSF på luftveissykdom.

Figurene 21-23 er grafiske fremstillinger av resultater oppnådd i eksempel 7 som vedrører infeksjon av kuer med *Klebsiella pneumoniae*.

Figurene 24-26 er grafiske fremstillinger av resultatene oppnådd i eksempel 8 hvor kuer med koliform jurbetennelse ble behandlet med G-CSF.

Figurene 27-29 er grafiske fremstillinger av resultatene oppnådd i eksemplene 10-12.

#### Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

G-CSF er effektiv ved behandling eller forhindring av infeksjoner hos dyr, særlig pattedyr.

Mange forskjellige infeksjoner som hjemsøker bovine dyr, fjærkre, svin, hester samt hunder og katter, lar seg behandle med G-CSF.

Jurbetennelse hos bovine dyr kan effektivt behandles med G-CSF. Med "bovine dyr" menes en ku eller okse. Også behandling eller forhindring av slike sykdommer som transportfeber hos kveg kan skje ved administrering av G-CSF. "Jurbetennelse" er en betennelsessykdom i melkekjertelen forårsaket av mange forskjellige patogene mikroorganismer, først og fremst gram-positive og gram-negative bakterier. En veterinær med gjennomsnittlig erfaring kan lett bestemme hvorvidt et dyr har en jurbetennelsesinfeksjon.

Ved å øke antallet neutrofiler i blodomløpet hos griser under et akutt utbrudd av pleuropneumonia økes beskyttelse mot infeksjon og alvorligheten av sykdommen reduseres og sannsynligheten for vedvarende infeksjoner. G-CSF kan brukes til å behandle eller forhindre porcine infeksjoner, slik som pleuropneumonia.

Med G-CSF er ment en av de hematopoietiske vekstfaktorer som er kjent som granulocytstkolonistimulerende faktorer. De biologiske aktivitetene av G-CSF-er omfatter: å stimulere differensieringen av et lite antall forløper-

"stamceller" til de mange blodcellelinjene, å stimulere proliferasjonen av disse blodcellelinjene og stimulere den endelige differensiering av fullt ferdige blodceller fra disse linjene. De foretrukne kilder for G-CSF-polypeptidet for behandling eller forhindring av jurbetennelse er humane og bovine og kan være naturlig utvunnet eller produktet av genetisk konstruerte vertceller inneholdende en DNA-sekvens som koder for G-CSF.

Den DNA som koder for G-CSF-genet, er en genom-DNA-sekvens, en cDNA-sekvens eller en produsert (eller syntetisk) DNA-sekvens som uttrykkes i en prokaryot eller eukaryot vertcelle som et polypeptid med en del av eller hele den primære strukturkonformasjon og én eller flere av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF. En biologisk funksjonell plasmid- eller virus-DNA-vektor inneholdende en DNA-sekvens som koder for G-CSF, kan anvendes til å transformere eller transfisere en prokaryot eller eukaryot vertcelle, hvorved det fås cellelinjer som uttrykker G-CSF-polypeptidet, glycosylert eller ikke-glycosylert.

De forskjellige formene av human G-CSF, inkludert deres fremstilling og rensing, som er nyttige ved en fremgangsmåte for behandling eller forhindring av jurbetennelse, er nærmere beskrevet i US patentskrift nr. 4.810.643.

US patentskrift nr. 4.810.643 beskriver og krever nye gensegmenter, biologisk funksjonelle rekombinante plasmider og virus-DNA-vektorer, og prokaryote og eukaryote vertceller, som inneholder et G-CSF-gen eller en genetisk konstruert variant av et G-CSF-gen. Vertcellene uttrykker biologisk aktiv G-CSF eller en genetisk konstruert variant av G-CSF.

Det er her beskrevet isoleringen og karakteriseringen av et bovin G-CSF-gen og særlig nye gensegmenter, biologisk funksjonelle, rekombinante plasmider og virus-DNA-vektorer, og prokaryote og eukaryote vertceller, som inneholder

et bovin G-CSF-gen eller en genetisk konstruert variant av et bovin G-CSF-gen. Vertcellene som er transformert eller transfektert med de rekombinante plasmider eller virus-DNA-vektorene, uttrykker biologisk aktiv, bovin G-CSF eller en 5 genetisk konstruert variant av bovin G-CSF. Det uttrykte protein isoleres og renses ved å bruke fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

DNA-sekvenser som koder for hele eller en del av bovin G-CSF, er tilveiebrakt. Slike sekvenser omfatter: 10 inkorporeringen av kodoner "foretrukket" for ekspresjon ved hjelp av utvalgte verter som ikke er pattedyr (f.eks. E. coli-foretrukne kodoner, se Nucleic Acids Res., 1986, vol. 14 (13), s. 5125-5143); tilveiebringelsen av seter for spalting ved hjelp av restriksjonsendonukleaseenzymer; til- 15 veiebringelsen av DNA-sekvenser som reduserer eller fjerner sekundærstrukturinteraksjoner som inhiberer transkripsjon og/eller translasjon; og tilveiebringelsen av ytterligere initielle, terminale eller mellomliggende DNA-sekvenser som letter inkorporering i ekspresjonsvektorer. DNA-sekvensene 20 omfatter også sekvenser med et optimalisert ribosombindende sete, og sekvenser som fremmer transkripsjon, translasjon og/eller sekresjon av proteinproduktet.

Det omtales også DNA-sekvenser som koder for mikro- biell ekspresjon av polypeptidanaloger eller derivater av 25 bovin G-CSF som adskiller seg fra naturlig forekommende former når det gjelder identiteten til eller lokaliseringen av én eller flere aminosyrerester (dvs. delesjonsanaloger som inneholder mindre enn alle restene angitt for bovin G-CSF, substitusjonsanaloger hvor én eller flere spesifiserte rester er 30 erstattet med andre rester, og i tillegg analoger hvor én eller flere aminosyrerester er addert til en terminal eller medial del av polypeptidet) og som har noen av eller alle egenskapene til felles med naturlig forekommende former.

Den klasse polypeptid som kodes for av deler av DNA-

komplementet til topptråden i bovine cDNA- eller genom-DNA-sekvenser ifølge figurene 2a eller 3, dvs. "komplementært inverterte proteiner" som beskrevet av Tramontano et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 5049-5059 (1984), er også omtalt.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte for isolering og rensing av polypeptidprodukter som har en del av eller hele den primære strukturkonformasjon (dvs. sammenhengende sekvens av aminosyrerester) og én eller flere av de biologiske egenskaper (f.eks. immunologiske egen-  
10 skaper og in vitro biologisk aktivitet) og de fysiske egenskaper (f.eks. molekylvekt) til naturlig forekommende bovin G-CSF inkludert allele varianter derav. Disse polypeptidene er også kjennetegnet ved å være produktet av prokaryot eller eukaryot vertekspresjon (f.eks. ved hjelp av bakterie-, gjær-,  
15 høyere plante-, insekt- og pattedyrceller i kultur) av eksogene DNA-sekvenser erholdt ved hjelp av genom- eller cDNA-kloning eller ved hjelp av gensyntese. Produktene av typiske gjær- (f.eks. *Saccharomyces cerevisiae*) eller prokaryote [f.eks. *Escherichia coli* (*E. coli*)] vertceller er frie for  
20 binding til pattedyrproteiner. Avhengig av den anvendte vert er polypeptidet glycosylert med pattedyr- eller andre eukaryote carbohydrater, eller er ikke-glycosylert. Polypeptidene kan også omfatte en start-metioninaminosyrerest (i stilling -1).

25 Farmasøytiske preparater med G-CSF i en farmasøytisk akseptabel bærer kan administreres intravaskulært, intraperitonealt, subkutant, intramuskulært eller ved innsprøyting i melkekjertel under anvendelse av former som er kjent innen den farmasøytiske teknikk. For intravaskulær, intraperitoneal,  
30 subkutan eller intramuskulær administrering, eller for administrering i melkekjertel, kan aktive legemiddelbestanddeler kombineres med en egnet bærer, slik som vann, saltoppløsning, vandig dextrose og lignende. Uansett administrasjonsveien som velges, formuleres preparatene til farmasøytisk akseptable

doseringsformer ved hjelp av vanlige metoder som er kjent for fagfolk innen teknikken. Fordelaktige formuleringer er beskrevet i US patentsøknad nr. 285.159. Ved én utførelsesform anvendes preparater med langvarig frigjørelse.

5 G-CSF kan anvendes som en profylaktisk behandling for å øke vertforsvaret til dyr med risiko for å erverve en bakterie-, gjær- eller soppinfeksjon. F.eks. kan G-CSF anvendes som en profylaktisk behandling hos normale menneskepasienter med risiko for å erverve lungebetennelse  
10 (f.eks. nosocomial lungebetennelse), kirurgiske sårinfeksjoner, urinveisinfeksjoner og tarminfeksjoner. Uttrykket "normal" betyr slik det her er brukt, et dyr som har normal immunfunksjon og normalt antall hvite blodlegemer og forskjell. En beskrivelse av de forskjellige nosocomiale  
15 infeksjoner som den profylaktiske behandling ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes mot, er angitt i Nelson et al., J. Critical Illness, s. 12-24 (april 1988). Som et profylaktisk middel administreres G-CSF vanligvis 0-3 dager før hendelsen (f.eks. kirurgi, vaskulær kanylering, kateter-  
20 innførsel, intubasjon) når det er en risiko for infeksjon. G-CSF administreres subkutant eller intraventrikulært daglig i doseområdet 1 - 20 µg/kg, mer fordelaktig 3 - 15 µg/kg. En person med erfaring innen teknikken vil vite hvordan dosen reguleres.

25 G-CSF kan også anvendes til å behandle en pasient øyeblikkelig eller snart, fordelaktig innen 8 timer, helst innen 4 timer, etter at pasienten har fått en traumatisk skade (f.eks. menneske- eller dyrebitt, skudd- eller knivsårl eller annet stikksår) som krever medisinisk eller kirurgisk behandling. G-CSF administreres før  
30 påvisning (f.eks. ved hjelp av standard mikrobiologisk eller histologisk undersøkelse av pasientens vev eller kroppsvæsker) eller klinisk manifestasjon og symptomer (f.eks. materiefyllt eksudat, frysninger, feber) på infeksjon.

Kveg behandles profylaktisk før transport eller andre hendelser som kan svekke kveget, for å forsterke og påvirke dets evne til å bekjempe infeksjoner. Administrering av G-CSF kan gjøres på det tidspunkt kveget bearbeides, dvs. vaksineres, merkes, etc. Behandling med G-CSF kan også gjøres under tørr ku-terapi og/eller like før en ku kalver for å redusere sannsynligheten for post partum intrauterine infeksjoner, og for jurbetennelse under de tidlige stadier av laktasjon. Se Kehrlí et al., Am. J. Vet. Res., 50, nr. 2, s. 207 (1989) for en beskrivelse av bovin neutrofil funksjon under periparturientperioden. Vanligvis er det ingen behandling med antibiotika like før kalving på grunn av rester som ville komme til syne i kumelken og gjøre den upassende for bruk.

Flere variabler vil bli tatt i betraktning av gjennomsnittsfagmannen ved bestemmelse av konsentrasjonen av G-CSF i de terapeutiske preparater og doseringer som skal administreres. Variabler omfatter administreringsvei og dyrets tilstand.

#### Rensing av G-CSF

G-CSF fremstilles i en uoppløselig form i E. coli. Rensefremgangsmåten beskrevet nedenunder, ble utviklet for å sikre et monomert, oxydert produkt. For å oppnå dette oppløseliggjøres proteinet i nærvær av et denatureringsmiddel og får oxydere i nærvær av dette denatureringsmidlet. Det oxyderte protein fjernes så fra denatureringsmidlet og renses til homogenitet. Den følgende beretning beskriver fremgangsmåten for rensing av human G-CSF med forskjeller angitt for rensingen av bovin G-CSF.

#### Cellelyse

350 g nedfrost cellepasta blandes med 2 - 3 liter 1 mM dithiothreitol (DTT) og dispergeres grundig. Cellesuspensjonen sendes så gjennom en Gaulin homogenisator i et tilstrekkelig antall sykluser til å oppnå mer enn 95% oppbrytning. Oppslemmingen avkjøles til  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  før homogenisering,

- og til under 18°C mellom sykluser gjennom homogenisatoren. Homogeniseringsoppslemmingen sentrifugeres for å utvinne pelleten som inneholder >95% av G-CSF som opprinnelig var til stede i cellepastaen. (Oppbrytningsblandingen av bovin G-CSF inneholder ikke noe DTT).

#### Ekstraksjon

Den homogeniserte pellet dispergeres så i ca. 3 liter 1% deoxycholat (DOC), 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 9. Denne suspensjonen omrøres ved 15-20°C i 30-40 minutter og sentrifugeres så. (Dette DOC-ekstraksjonstrinn brukes ikke for bovin G-CSF). Pelleten resuspenderes så i omtrent 3 liter kaldt vann og resentrifugeres. G-CSF utvinnes i pelleten i et totalt utbytte på >80%. Som et alternativ til deoxycholat anvendes et annet gallesalt eller ikke-ionisk vaske-

#### Oppløseliggjøring og oxydasjon

Sluttpelleten erholdt fra de ovenfor nevnte ekstraksjoner, oppslemmes i omtrent 2,5 liter 2% "Sarkosyl", 40 mM Tris (pH 8,0) og får oppløseliggjøres ved 15 - 20°C i 30 minutter. Kobbersulfat tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 40 µM, og blandingen omrøres i minst 12 timer ved 15 - 20°C. Omtrent 70% av G-CSF oxyderes til den korrekte monomere form under denne fremgangsmåte.

#### Fjerning av "Sarkosyl"

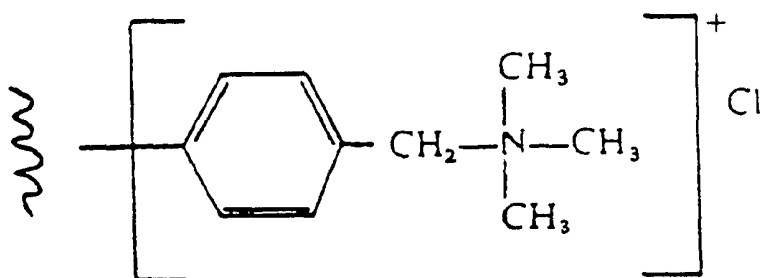
Den resulterende oppløseliggjorte proteinblanding sentrifugeres for å fjerne uoppløselige rester og fortynnes så fire ganger med 13,3 mM Tris, pH 7,7. Ca. 2000 g "Dowex" ekvilibrert i 20 mM Tris, pH 7,7, tilsettes så. "Dowex" er en ionebytterharpiks. Se Dowex: Ion Exchange, The Dow Chemical Company, Midland, MI (1988). Fortrinnsvis anvendes "Dowex" 1X4 20 - 50 mesh type I som er en sterkt basisk anionbytterharpiks i kloridform. Denne harpiksen er en 4% kryssbundet styren-divinylbenzen-polymermatriks med funksjonelle kvaternære ammoniumgrupper som tjener som steder for

ionebytting. "Type I" betyr at ammoniumgruppen er sammensatt av et nitrogenatom bundet til en polymer benzylgruppe som er festet til matriksen, og tre methylgrupper. Mesh-størrelsen måles som våt harpiks på US standardsikt. Ammoniumgruppen er positivt ladet; denne funksjonalitet vil bytte ut dens bundne kloridion med andre negativt ladede ionearter i en reversibel reaksjon. "Dowex" 2 harpiks er en type II harpiks hvor en av methylgruppene er erstattet med en ethanolgruppe.

10

Type I

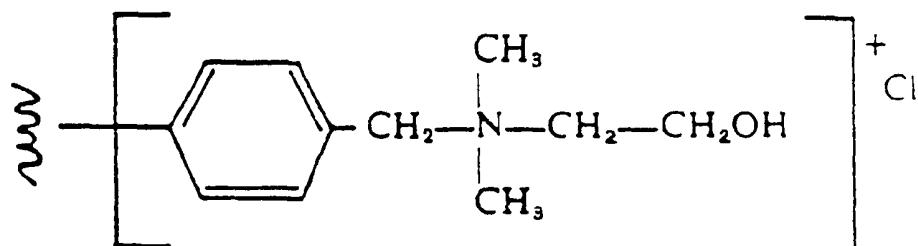
15



20

Type II

25



30

Harpikser av type I og type II adskiller seg primært ved sine affiniteter for hydroxydionet i forhold til andre anioner, og ved kjemisk stabilitet. Harpikser av type II omdannes mer effektivt til hydroxydformen enn harpikser av type I, men harpikser av type I er ifølge sakens natur mer stabile kjemisk, spesielt i hydroxydformen.

Anionbytterharpiksene som inneholder kvaternært ammonium, er svært ioniserte og kan anvendes over hele pH-området. De har også evne til salt-splittingsreaksjoner som omdanner et nøytralt salt til den tilsvarende base.

Andre ionebytterharpikser som har sterke anionbytteregenskaper hvor ladningen er utilgjengelig for proteinene av interesse, er alternativer til bruken av "Dowex" i foreliggende oppfinnelse.

Denne blandingen får omrøres i minst 1 time ved 15 - 20°C for å fjerne "Sarkosyl" (N-lauroylsarcosin-natrium-salt) fra proteinoppløsningen, og "Dowex" filtreres så ut. Mer enn 80% av den korrekt oxyderte form av G-CSF kan utvinnes. (Den bovine G-CSF bearbeides ved 2 - 8°C under dette trinn).

#### Anionbytterkromatografi (dette trinnet brukes ikke for bovin G-CSF)

Den resulterende proteinoppløsning tilføres en DEAE-cellulosekolonne (Whatman DE-52 eller ekvivalent) ekvilibrert i 20 mM Tris, pH 7,7. Kolonnen vaskes med 20 mM Tris, pH 7,7, inntil absorbansen ved 280 nm for eluenten er omtrent null. G-CSF elueres så bort fra kolonnen med 20 mM Tris, 40 mM NaCl, pH 7,7.

#### Kationbytterkromatografi

Eluenten fra DEAE-kolonnen reguleres til pH 5,4 med 50% eddiksyre og fortynnes minst to ganger med 5 mM natriumacetat, pH 5,4. Oppløsningen fylles på en CM-"Sephrose"-kolonne med hurtig gjennomstrømning ekvilibrert i 20 mM natriumacetat, pH 5,4. Etter påfylling vaskes kolonnen med 20 mM natriumacetat, pH 5,4, inntil absorbansen ved 280 nm er omtrent null. G-CSF elueres så med 20 mM natriumacetat, 37,5 mM NaCl, pH 5,4. (Den bovine G-CSF elueres bort ved 150 mM NaCl i den samme buffer).

De følgende eksempler er fremlagt som illustrasjon på oppfinnelsen og er særlig rettet mot fremgangsmåter utført før identifikasjon av bovine G-CSF-genom- og cDNA-kloner,

• mot fremgangsmåter som resulterer i slik identifikasjon og mot sekvenseringen, fremkallingen av ekspresjonssystemer basert på genom-, cDNA- og produserte (eller syntetiske) gener og verifikasjon av ekspresjon av bovin G-CSF og analog-  
5 produkter i slike systemer. Fremgangsmåten for isolering av det bovine G-CSF-gen beskrevet nedenunder, kan også anvendes til å isolere andre dyre-G-CSF-gener som igjen kan anvendes til å fremstille annen dyre-G-CSF. I tillegg illustrerer  
10 eksemplene fremgangsmåter for behandling eller forhindring av infeksjoner hos dyr som omfatter administrering av en effektiv mengde av G-CSF.

#### Eksempel 1

15 Screening av et genombibliotek med hensyn på det bovine G-CSF-gen

I dette eksemplet ble en cDNA-klon som koder for human G-CSF som beskrevet i US patentskrift nr. 4810643, brukt til å sortere med hensyn på en genomklon som inneholder et bovint G-CSF-gen. En fag ("Charon" 28) bovint genom-  
20 bibliotek fremstilt ifølge fremgangsmåten til Woychick et al., Nucleic Acid Research, 10(22): s. 7197-7210 (1982) og erholdt fra J. Bloom og F. Rothman, ble platet ut på E. coli stamme K802 og sortert under anvendelse av en nick-translatert probe bestående av et humant G-CSF-cDNA-fragment iso-  
25 lert fra HgiAI til StuI. Tilsammen omtrent  $1,2 \times 10^6$  fager ble platet ut på 12, 15 cm petriskåler, plakk løftet av og hybridisert til probe under anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet i Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1982). I alt 7 positive kloner ble observert.  
30 Tre kloner som ga de sterkeste signalene etter autoradiografi i en andre screening, ble dyrket i 1 liter kulturer, og fag-DNA ble fremstilt som beskrevet i Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1982). Denne DNA ble kartlagt ved hjelp av restriksjonsenzymoppløsning og  
35 Southern blotting under anvendelse av den radioaktivt merkede HgiAI-StuI-probe. Kartleggingsresultatene viste at et BamHI-fragment på ca. 3000 baser inneholdt hele G-CSF-

området. DNA fra klon 2 ble oppløst med BamHI for å frigjøre et omtrent 3000 bp stort bovin G-CSF-holdig fragment som deretter ble underklonet inn i pUC9 og ytterligere kartlagt ved restriksjonsendonukleaseoppløsninger og Southern blotting.

Et restriksjonsendonukleasekart (omtrent 3,0 kb) av genom-DNA inneholdende det bovine G-CSF-gen, er vist i figur 1. Sekvensen for hele det kodende område til den fullt ferdige bovine G-CSF ble bestemt ved å underklone fragmenter inn i M13 og sekvensere dem ved hjelp av dideoxymetoden, Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463 (1977). Sekvenser ble bekreftet eller utledet ved å benytte interne primere av de samme kloner. Sekvensen for det kodende område ble utledet ved direkte sammenligning med den humane genome G-CSF-sekvens (figur 3) og er vist i figur 2a. Steder for sammenføring og aminoendebearbeiding av proteinet ble antatt å oppstå på de samme stedene som for den humane G-CSF. DNA-sekvensen koder for et fullt ferdig protein med den samme lengde som den humane G-CSF (174 aminosyrer), og proteinene er 82% homologe.

### Eksempel 2

Konstruksjon av syntetiske bovine G-CSF-gener og ekspresjon av bovin G-CSF

Dette eksemplet vedrører fremstilling av konstruerte gener som koder for bovin G-CSF og omfatter E. coli preferanse-kodoner, og ekspresjon av bovin G-CSF.

Syntetiske gener ble utformet for å muliggjøre ekspresjonen av bovin granulocyttkolonistimulerende faktor (bG-CSF) i E. coli [bG-CSF-dna (figur 4) og bG-CSF-dna 4 (figurene 5-7)]. bG-CSF er 174 aminosyrer lang og er 82% homolog med humanformen av G-CSF (174 aminosyrer). Det bovine protein inneholder fem ytterligere ladede rester (arg og glu) enn hG-CSF gjør og antas derfor å være mer hydrofilt.

Genene bG-CSF-dna (figur 4) og bG-CSF-dna4 (figurene 5-7) ble utformet med maksimal "bias" for E. coli kodonpreferanse. For gen bG-CSF-dna ble det i tillegg til

den kodende sekvens tatt med en start-ATG, et ribosom-  
bindende sete, to termineringskodoner og et 5' XbaI- og  
3' BamHI-restriksjonssteder. Gen bG-CSF-dna4 ble også ut-  
formet slik at det hadde minimale sekundære interaksjoner  
5 og tilstrekkelig unike restriksjonssteder for underenhets-  
sammenføyning og genmanipulering. Unike BamHI- og PstI-  
steder ble inkorporert i stillinger som var identiske med de  
som finnes i hG-CSF-genet angitt i US patentskrift nr.  
4810643. Dette muliggjør generering av unike humane/bovine  
10 hybridgener og deres proteinprodukter.

Genet ble utformet som to underenheter (underenhet I  
XbaI-HindIII, og underenhet II HindIII-EcoRI) for kloning inn  
i sekvenserings/ekspressjons-vektorer (figur 6). Under-  
enhet I inneholder en kort ledersekvens med en XbaI-klonings-  
15 ende og det ribosombindende sete (RBS). Underenhet II inne-  
holder et par overflødige stoppkodoner og EcoRI-klonings-  
enden.

Kort sagt var den anvendte fremgangsmåte generelt som  
angitt i beskrivelsen i PCT patentsøknad med publikasjonsnr.  
20 WO83/04053. Genene ble utformet for initiell sammensetning  
av komponentoligonukleotider (figur 5) i multiple duplekser  
som igjen ble satt sammen til to adskilte avsnitt (figur 6).  
Disse avsnittene ble utformet for hurtig amplifikasjon og  
kunne, etter fjerning fra amplifikasjonssystemet, settes  
25 sammen sekvensvis eller gjennom en multippelfragmentligering  
til en egnet ekspressjonsvektor.

Konstruksjonen av avsnittene I og II er illustrert i  
figurene 5 og 6. Ved konstruksjonen av avsnitt I ble, som  
vist i figurene 5 og 6, 16 oligonukleotider satt sammen til  
30 8 duplekser. De 8 dupleksene ble så ligert, hvorved av-  
snitt I ble dannet. Det kan også legges merke til i figur 6  
at avsnitt I omfatter en oppstrøms XbaI "sticky" ende og en  
nedstrøms HindIII "sticky" ende som er nyttige for ligering  
til amplifikasjons- og ekspressjonsvektorer, og for ligering  
35 til avsnitt II.

Avsnitt II ble konstruert som vist i figurene 5 og 6.  
For denne konstruksjon ble 16 oligonukleotider satt sammen

til 8 duplekser. De 8 dupleksene ble så ligert, hvorved avsnitt II ble dannet som vist i figur 6. Som også vist i figur 6, omfatter avsnitt II en oppstrøms HindIII "sticky" ende og en nedstrøms EcoRI "sticky" ende som kan anvendes for ligering til amplifikasjons- og ekspresjonsvektorer, og til avsnitt I.

Selv om enhver egnet vektor kan anvendes til å uttrykke denne DNA, kan ekspresjonsplasmidet pCFM1156 lett konstrueres fra et plasmid pCFM836 hvis konstruksjon er beskrevet i publisert europeisk patentsøknad nr. 136.490 og i US patentskrift nr. 4710473. pCFM836 kuttet først med Nde I og gjøres så butt i enden med Pol I slik at begge de eksisterende Nde I-seter ødelegges. Deretter oppløses vektoren med Cla I og Sac II for å fjerne en eksisterende polylinker før ligering til en substituttpolylinker. Denne substituttpolylinker kan konstrueres ifølge fremgangsmåten til Alton et al., supra. Ekspresjonskontroll i pCFM1156-plasmid skjer ved hjelp av en lambda-P<sub>L</sub>-promoter som selv kan være under kontroll av et CI857 repressorgen (slik som tilveiebrakt i E. coli stamme K12 Htrp eller FM5). FM5 er beskrevet i Burnette et al. Bio/Technology, vol. 6, s. 699 (1988).

Avsnitt I ble først klonet inn i M13 fra XbaI til HindIII og sekvensert ved hjelp av dideoxymetoden til Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463 (1977). Avsnitt II ble klonet inn i M13 fra HindIII til EcoRI og ble også sekvensert ved hjelp av dideoxymetoden. Avsnitt I ble kuttet ut av M13 fra XbaI til HindIII, og avsnitt II ble kuttet ut av M13 fra HindIII til EcoRI. Disse to fragmentene ble så ligert med pCFM1156 kuttet fra XbaI til EcoRI og transformert inn i E. coli stamme FM5 (eller andre egnede E. coli vertceller kjent for fagfolk innen teknikken), hvorved pCFM1156bG-CSF ble generert.

Dette plasmidet inneholder  $\lambda$ P<sub>L</sub>-promoter/operatorområdet og har et temperaturfølsomt replikon. Når E. coli stamme FM5 som inneholder pCFM1156bG-CSF, dyrkes ved 28°C, holdes plasmidkopi antallet ved 10 - 20 kopier/celler, og transkripsjon fra  $\lambda$ P<sub>L</sub>-promoterens reguleres ved hjelp av en

temperaturfølsom repressor. Vekst ved 42°C resulterer i et økt kopiantall og frigjørelse av represjon i  $\lambda$ pL-promoterens. Rekombinant bovin G-CSF begynner å akkumulere ved forhøyede temperaturer som resultatet av promoteraktivering og plasmid-amplifikasjon.  $\lambda$ pL-promoterens ligger like oppstrøms fra det ribosombindende sete og methionin-startkodonet til bovin G-CSF. Transkripsjonsterminatoren, t-*oop*, ligger like nedstrøms fra de to translasjons-stoppkodonene nær 3'-enden til genet. Stammer som inneholder plasmidet, pCFM1156bG-CSF, uttrykker r-metbG-CSF ved opptil 5% av det samlede cellulære protein.

For å øke ekspresjonen av bovin G-CSF ble det syntetiske gen klonet ut av pCFM1156bG-CSF og inn i pCFM536 fra *Xba*I til *Kpn*I, hvorved pCFM 536 bG-CSF1 ble generert. Denne konstruksjon ble transformert inn i FM5, og bovin G-CSF ble uttrykt ved opptil 10% av det totale protein. Ved å bruke oligonukleotidet

TTA ATA ATG ATC CCA TTA GGT CCT GCA CGT TCT,

ble stedrettet mutagenese (se eksempel 3 med hensyn på metode) utført for å endre kodonene for prolinet, leucinet og glycinet i stilling 3, 4 og 5 fra CCG, CTC og GGC til CCA, TTA og GGT. Denne nye konstruksjonen, pCFM 536 bG-CSF2, ble transformert inn i FM5, og med denne konstruksjonen uttrykkes bovin G-CSF ved opptil 30% av det totale protein.

#### Rensing av bovin G-CSF fra E. coli

1. Celleoppbrytning og "Sarkosyl"-oppløseliggjøring og oxydasjon

Ca. 100 g cellepasta ble veid ut og på nytt oppslømmet i 2,5 liter vann. Cellene ble dispergert med en egnet blander inntil de var fullstendig dispergert. Suspensjonen ble sendt gjennom Gaulin-homogenisatoren fire ganger ved 8000 psig, idet temperaturen ble holdt under 18°C. Homogenatet ble sentrifugert i en Beckman J2-21 sentrifuge under anvendelse av JA-10-rotoren ved 10.000 rpm ved 4°C i 30 minutter.

Supernatanten ble dekantert og kastet. Pelleten ble oppslemmet på nytt i 2,5 liter kaldt vann og sentrifugert i en J2-21 sentrifuge under anvendelse av JA-10-rotoren ved 10.000 rpm ved 4°C i 30 minutter. Supernatanten ble dekantert og kastet. Pelletene ble på nytt oppslemmet i 380 ml vann og 20 ml 1M Tris, pH 8, 100 ml 10% "Sarkosyl" og 0,5 ml 1% kobbersulfatpentahydrat ble tilsatt. Blandingen ble omrørt over natten ved værelsetemperatur. Materialet ble sentrifugert i J2-21-sentrifugen under anvendelse av JA-10-rotoren i 30 minutter ved 10.000 rpm ved 4°C. Supernatanten ble dekantert og tatt vare på. Pelletene ble kastet.

## 2. "Dowex"-fjerning av "Sarkosyl"

Ca. 500 ml kaldt vann og 1 liter kald 20 mM Tris, pH 8, pluss 400 g "Dowex" (ekvilibrert i 20 mM Tris, pH 8) ble tilsatt til supernatanten. Blandingen ble omrørt ved 4°C i 90 minutter. Oppslemmingen ble filtrert gjennom en kolonne og det gjennomstrømmende samlet opp. Harpiksen ble vasket med 400 ml 20 mM Tris, pH 7,7, og denne vasking ble tilsatt til det gjennomstrømmende, hvorved man fikk 2,4 liter.

## 3. CM-"Sephарose" hurtigstrømningskromatografi

pH i materialet ble regulert til 5,4 under anvendelse av 50% eddiksyre, og så ble det sentrifugert i J2-21-sentrifugen under anvendelse av JA-10-rotoren ved 10.000 rpm og 4°C i 25 minutter. Supernatanten ble dekantert og tatt vare på. Pelleten ble kastet. Supernatanten ble fylt direkte på en 80 ml CM-"Sephарose"-ionebytterkolonne ekvilibrert i 20 mM natriumacetat, pH 5,4. Kolonnen ble vasket med 100 mM NaCl i startbuffer og så eluert med 150 mM NaCl i startbuffer. Omtrent 850 ml eluent inneholdende bovin G-CSF ble samlet opp.

## 4. Diafiltrering

Den 150 mM NaCl-eluering fra CM-"Sephарose"-kolonne materialet ble regulert til pH 3,5 med 0,1N HCl, og så diafiltrert under anvendelse av en ultrafiltreringsanordning for tangentialstrømning ("Pellicon") utstyrt med membraner med

- molekylvekt 10.000 mot 0,35 mM HCl/vann, pH 3,5. Sluttvolumet ble regulert, hvorved man fikk bovin G-CSF ved 2 mg/ml.

### 5 Eksempel 3

#### Konstruksjon av bovine G-CSF-analoger

Dette eksemplet vedrører bruken av rekombinante fremgangsmåter for generelle analoger av bovin G-CSF hvor cysteinet i stilling 17 individuelt ble erstattet med et  
10 serin.

Fremgangsmåter for stedrettet mutagenese ifølge Souza et al., PCT patentsøknad med publikasjonsnr. WO85/00817, publisert 28. februar 1985, ble utført under anvendelse av  
15 oligonukleotidet CTGCTGAAATCCCTCGAACAG.

#### Rensing av bovin G-CSF-analog fra E. coli

##### 1. Celleoppbrytning og urea-oppløseliggjøring og oxydasjon

Ca. 100 g cellepasta ble veid ut og på nytt oppslemmet i 2,5 liter vann. Cellene ble dispergert med en egnet  
20 blander inntil de var fullstendig dispergert. Suspensjonen ble sendt gjennom en Gaulin homogenisator fire ganger med 8000 psig idet temperaturen ble holdt under 18°C. Homogenatet ble sentrifugert i J2-21-sentrifugen under anvendelse av JA-10-rotoren ved 10.000 rpm og 4°C i 30 minutter. Super-  
25 natanten ble dekantert og kastet. Pelletene ble på nytt oppslemmet i 2,5 liter kaldt vann og sentrifugert i J2-21-sentrifugen under anvendelse av JA-10-rotoren ved 10.000 rpm og 4°C i 30 minutter. Supernatanten ble dekantert og kastet. Pelletene ble på nytt oppslemmet i 120 ml vann, og 40 ml 1M  
30 Tris, pH 8,5, og 640 ml 10M urea ble tilsatt. Blandingen ble omrørt i 2-3 timer ved værelsetemperatur og så fortynnet 1:10 med 20 mM Tris, pH 8,5. Blandingen ble så omrørt over natten ved værelsetemperatur. Materialet ble sentrifugert i Beckman J6-B-sentrifugen med en JS 4.2 rotor ved 4200 rpm  
35 og 4°C i 45 minutter. Supernatanten ble dekantert og tatt vare på. Pelletene ble kastet. Supernatanten ble regulert til pH 5,4 med 50% eddiksyre, og materialet ble sentrifugert

i J6-B under anvendelse av JS 4.2-rotoren ved 4200 rpm og 4°C i 45 minutter. Supernatanten ble dekantert og tatt vare på. Blandingen ble så fylt direkte på en 100 ml CM-"Sephарose"-ionebytterkolonne ekvilibrert i 20 mM natriumacetat, pH 5,4. Kolonnen ble vasket med 100 mM NaCl i startbuffer og så eluert med 150 mM NaCl i startbuffer. Omtrent 775 ml eluent inneholdende bovin G-CSF, ble samlet opp.

## 2. Diafiltrering

Den 150 mM NaCl-eluering fra CM-"Sephарose"-kolonne-materialet ble regulert til pH 3,5 med 0,1N HCl og så diafiltrert under anvendelse av en ultrafiltreringsanordning for tangentialstrømning ("Pellicon") utstyrt med membraner med molekylvekt 10.000 mot 0,35 mM HCl/vann, pH 3,5. Sluttvolumet ble regulert slik at man fikk bovin G-CSF ved 2 mg/ml.

## Behandlingsfremgangsmåte for infeksjon med Pasteurella hemolytica

En G-CSF-undersøkelse ble utført på kveg utfordret med Pasteurella hemolytica. Kalver som veide omtrent 60 kg, ble oppdelt i to grupper à 11. Begge gruppene fikk 5 ml bakterier ( $3 \times 10^7$ /ml) intratrakealt på dag 1. 4 timer før utfordring ble kalvene behandlet med en svak oppløsning (pH  $\approx$  5,5) av eddiksyre via transtrakeal administrering. Gruppen som mottok subkutant administrert human G-CSF (10 µg/kg), var blitt forbehandlet i 4 dager før infeksjon og ble behandlet daglig i de gjenværende 9 dager av undersøkelsen.

Alt kveg, bortsett fra ett i kontrollgruppen, oppviste kliniske (subjektiv poengsetting) og histologiske tegn på lungebetennelse. Selv om det G-CSF-behandlede kveg ikke ble beskyttet mot infeksjonen, var deres kliniske status ved slutten av undersøkelsen bedre enn kontrollgruppens, ikke bare basert på deres kliniske poengtall, men også på patologisk bedømmelse (%) av lungeinnblanding. I tillegg døde 3 kuer i kontrollgruppen, mens ingen i den behandlede

• gruppe døde. Figur 8 viser antall hvite blodlegemer (WBC) som funksjon av tiden. Figur 9 viser antall neutrofiler som funksjon av tiden. Figur 10 illustrerer båndantall som funksjon av tiden. Antall neutrofiler omfatter summen av  
5 Segs (for det meste fullt ferdige neutrofiler) og Bands (neutrofiler som er litt mindre ferdige enn Segs). Figur 11 viser sykelighet som funksjon av tiden, figur 12 viser prosent lungeinnblanding (prosent påvirket lunge) kontra tiden.

10

Anvendelsen av G-CSF som et preventivt/terapeutisk middel for kontroll av bovin luftveissykdom

15 Formålet med denne undersøkelse var å bestemme virkningsfullheten av human G-CSF når det gjelder å kontrollere bovin luftveissykdom (BRD) forårsaket av Pasteurella haemolytica. Gruppene var som følger (10 kalver/gruppe):

- 20 Gruppe 1: Infiserte, ikke-medisinerte  
Gruppe 2: Infiserte, medisinerte (med start 5 dager før utfordring)  
Gruppe 3: Infiserte, medisinerte (med start 12 timer før utfordring)

25 Holstein oksekalver som var 1-2 dager gamle, ble innkjøpt. Kalvene ble plassert i individuelle kalvebåser og startet på en diett med 3,8 liter melk fordelt to ganger pr. dag. Ved 7-dagers alder ble det tilbudt fritt valg av kalvekorn, og ved 7-dagers alder ble det tilbudt fritt valg av vann.

30 Fem dager før utfordring (dag -5) fikk alle kalvene i gruppe 2 10 µg/kg/kalv G-CSF administrert SQ, SID. 12 timer før utfordring (dag -1/2) fikk kalver i gruppe 3 10 µg/kg/kalv G-CSF administrert SQ, SID. Kalver i gruppe 1 fikk bærerkontroll idet man startet ved tidspunktet for utfordring (dag 0). Kalver forble på medisineringsen til dag 9 (dag før  
35 avslutning av undersøkelsen).

Medisineringsen ble gitt som 0,27 mg/ml oppløsning og administrert ved å injisere 10 µg/kg, SQ, SID. Bærerkontrollen ble administrert ved å injisere 2 ml, SQ, SID.

Behandlingsnivåene var som følger:

Gruppe 1: Bærerkontroll, gruppe 2: 10 µg/kg G-CSF, SQ, SID, idet man startet på dag -5, gruppe 3: 10 µg/kg, SQ, SID.

Kalvene ble utfordret da de var 25 dager gamle (dag 0). 4 timer før utfordring ble kalvene behandlet med en svak oppløsning (pH ≈ 5,5) av eddiksyre via transtrakeal administrering. Utfordring med *Pasteurella haemolytica* skjedde ved å injisere 5 ml av en  $1 \times 10^8$  dyrkningskultur av utfordringsorganismen som hadde stått over natten. Kalver ble overvåket i ialt 10 dager.

På dag 10 ble kalvene avlivet og obdusert. Lungene ble bedømt med hensyn på graden av lungebetennelse og dyrket for bakteriologi. Figur 14 (se figur 13) viser den relative sykелighet til de tre gruppene. Sykелighet var basert på kroppstemperatur, forforbruk og tilstand. Figurene 15, 16 og 17 illustrerer hhv. WBC (antall hvite blodlegemer), PMN (neutrofiler) og bånd versus tid.

Virkningene av G-CSF på hyppigheten og varigheten av luftveissykdom og immunologiske og klinisk-patologiske parametre hos kalver

Formålet ved denne undersøkelse var å bestemme virkningen som administrering av human G-CSF har på hyppigheten og varigheten av luftveissykdom hos kalver. Overvåkede parametre omfattet sykелighet, dødelighet, fullstendige blodtelling og respons på antigener og fremkalling av antigener. Undersøkelsen ble utført i et kommersielt kalvefjøs.

60 Holstein oksekalver som var omtrent 21 dager gamle, ble innkjøpt og plassert i et kalvefjøs over en 3-dagers periode (dag -3 til dag -1). Etter hvert som kalvene ble plassert i fjøset, ble de fordelt til én av to grupper. Kalvene ble plassert i individuelle kalvebåser som det var 30 av i en rekke, med to rekker og en 1,2 meter gangvei mellom rekkene. Kalvene ble plassert på en alternerende måte. Et jevnt antall kalver ble plassert hver dag. Under-

søkelsen av kalver ble startet på den dagen de ble plassert i fjøset. Dag 1 av undersøkelsen begynte når kalven faktisk ble plassert i fjøset. Med andre ord var det 3 dag 1 avhengig av den faktiske startdag. Alle påfølgende dager var basert på den faktiske startdag.

Idet man startet på dag 1, fikk kalvene i gruppe 1 daglig injeksjoner av 10 µg G-CSF/kg kroppsvekt. Kalver i gruppe 2 fikk daglig injeksjoner av en bærerkontroll. Injeksjonene fortsatte i 21 på hverandre følgende dager.

Idet man startet på dag 1, ble kalvene overvåket daglig med hensyn på tegn til luftveissykdom av dyrehelsepersonalet. De fysiske tegn som ble overvåket, var kroppstemperatur, appetitt, pustehyppighet og holdning. Overvåkingen fortsatte i 30 på hverandre følgende dager (dag 1 til dag 30). Hver kalv som viste tegn på luftveissykdom (se diagnosekriterier nedenunder), ble plassert på behandling ifølge behandlingsplanen angitt nedenunder. Alle behandlinger ble registrert. Alle kalver som døde under undersøkelsen, ble obdusert.

På dag 1 (før start av injeksjoner), 7, 14, 21 og 28 ble det tatt blodprøver av alle kalver for fullstendige blodtelling (CBC). I tillegg ble blod for CBC-er tatt på den 1. og 4. dag av luftveissykdom. Utførte tester omfattet pakket celle volum (PCV), totalt antall røde og hvite blodlegemer og en forskjell.

Det ble oppstartet behandling på alle kalver som ble syke. Varigheten og typen av behandling ble registrert.

Sammenligninger ble gjort mellom gruppene 1 og 2 med hensyn på effektene av G-CSF på fullstendige blodtelling, sykkelighet på grunn av luftveissykdom målt ved hjelp av daglige observasjoner og dødelighet.

## OVERVÅKNINGSKRITERIER FOR LUFTVEISSYKDOM

	NORMAL	UNORMAL
5 KROPPSTEMPERATUR	<103,5	>103,5
APPETITT	1	2, 3 & 4
1=Drikker hele melkemengden		
2=Drikker 3/4 av melken		
3=Drikker 1/2 av melken		
10 4=Drikker <1/2 av melken		
PUSTEHYPPIGHET	1	2 & 3
1=Normal		
2=Svakt forhøyet		
15 3=Svært forhøyet		
HOLDNING	1	2, 3 & 4
1=Normal		
2=Svakt nedtrykt		
20 3=Middels nedtrykt		
4=Alvorlig nedtrykt		

Behandlingsplan

25 Behandling nr. 1: 11 mg/kg oxytetracyklin, IM. Varigheten av behandlingen var basert på responsen til kalven. Behandlingen fortsatte i 2 dager etter at parametere vendte tilbake til normalt, med et minimum på 4 dager og et maksimum på 8 dager. Dersom kalver ikke ga respons på behandling nr. 1, ble de satt på behandling nr. 2.

30 Behandling nr. 2: 55,1/kg sulfadimethoxin, PO, 1. dag, 27,6 mg/kg andre og etterfølgende dager. Maksimalt 5 dager.

Figur 18 illustrerer behandlingsdagene for kalver i gruppe 1 (fikk G-CSF), brutt opp i første behandlingsdag (T1), andre behandlingsdag (T2), ...første dag av det andre behandlingsforløp (T1B), ...femte dag av det andre behandlingsforløp (T5B). Den behandlede gruppe har konsekvent et lavere antall totale behandlinger for hvert behandlingstidspunkt.

Det er en svak tilbøyelighet til en større forskjell mellom behandlede og kontroller etter hvert som antallet behandlinger øker. Når man f.eks. starter med T4, øker forskjellen mellom de behandlede og kontrollkalvene til ca. en 40% forbedring, sammenlignet med 15% for de tidligere behandlinger.

Figur 19 illustrerer det totale antall behandlinger pr. dag for kontrollene vs. de behandlede kalver. Igjen viser dette reduksjonen i behandlinger som er påkrevet for de behandlede kalver vs. kontrollene. Forbedringen varierer fra nært opptil 50% til tider, til 0%. Den totale gjennomsnittlige % forbedring for de behandlede kalver er 36%.

Figur 20 illustrerer frekvensen av antall kalver pr. dag med temperaturer over  $39,7^{\circ}\text{C}$ . Dataene svarer svært godt til det samlede antall behandlingsdager. Det er en konsekvent forbedring i temperaturer for de behandlede kalver vs. kontrollene. Den prosentvise forbedring er hovedsakelig den samme som det totale antall behandlingsdager (39,9%).

G-CSF reduserer signifikant alvorligheten og lengden av luftveissykdommen sammenlignet med placebo-behandlede kontroller når den administreres til unge kalver i kjøttproduksjon før de ble infisert med BRD og under infeksjon. G-CSF-behandlede kalver hadde mindre luftveissykdom (27%) sammenlignet med kontroller, og de ble også snarere friskere (47% forbedring).

#### Klebsiella pneumonia

Formålet med denne undersøkelse var å bestemme om økning av den neutrofile samling av celler i blodomløpet ville la melkekuen gi respons på en mer rettidig måte etter bakterieutfordring av melkekjertelen.

#### G-CSF-protokoll:

1) Administreringen av den humane G-CSF begynte to dager etter ankomst og innledende evaluering (PM-melking), og ble fortsatt gitt ved PM-melkingen i tilsammen 15 dager.

- 2) Dose/vei: 10,0 µg/kg daglig via subkutan administrering.  
 3) Kontrollutfordringsgruppe fikk 1,0 µg/kg G-CSF (daglig) via subkutan administrering i 8 dager, idet man begynte på dag 12.

MODELL MED JURBETENNELSEUTFORDRING:

- 1) Organisme: Klebsiella pneumoniae ble gitt på morgenen den 6. dag etter begynnelsen av G-CSF-administrering.  
 2) Dose: 1,0 ml (omtrent 200.000 CFU) administrert aseptisk via strykekanalen inn i venstre bakre (D) fjerdedel. Det gjenværende av fjerdedelen ble brukt som kontroller.  
 3) Ingen melkeprøve ble tatt før 3 timer etter utfordringen for å la bakteriene få tid til å etablere seg i fjerdedelen.  
 4) Ingen antibiotisk terapeutisk inngripen ble brukt under forsøket med unntak av væsketerapi dersom det var påkrevet.

FORSØKSGRUPPER:

Tx-utfordring	(n=3) kuøreflik nr.:	736, 924, 964
TX-kontroll	(n=3) kuøreflik nr.:	248, 293, 790
Kontrollutfordring	(n=3) kuøreflik nr.:	124, 771, 4179

Representative resultater er vist i figurene 21-23.

24 timer etter utfordringen klappet en uavhengig kliniker alle 36 jur. Klinikeren utpekte de infiserte fjerdedelene blant alle de 36 fjerdedelene; disse var de utfordrede fjerdedeler fra de tre ubehandlede kuer.

Fremgangsmåte for forhindring av koliform jurbetennelse

Dette eksemplet er rettet mot en fremgangsmåte ved å bruke G-CSF i forhindringen av koliform jurbetennelse hos lakterende kuer. For å teste virkningsfullheten av human G-CSF når det gjelder å forhindre de kliniske virkningene av koliform jurbetennelse hos lakterende melkekuer, ble kuene gitt en forsøksutfordring med en patogen E. coli.

12 Holstein melkekuer midt i lakteringsperioden ble tilfeldig fordelt til 1 av 2 grupper. Bare kuer med melkekulturer som var negative til koliforme bakterier, og med en negativ CMT ("California Mastitis Test"), ble brukt i den eksperimentelle undersøkelsen. De to gruppene var: Gruppe 1 (infiserte, ikke-medisinerte kontroller) og gruppe 2 (infiserte, medisinerte med 3 µg/kg av G-CSF).

Den grunnleggende fremgangsmåten omfattet å behandle kuene med G-CSF (gruppe 2) fra dagene 1-17, så utfordre på dag 10 og endelig overvåke dødelighet og sykkelighet i dagene 11-21. Gruppe 1 fikk placeboinjeksjoner av saltoppløsning på dagene 1-17.

Den spesifikke plan var som følger:

15

DAG	G-CSF	CBC <sup>1</sup>	CMT <sup>2</sup>	SCC <sup>3</sup>	MELKE-KULTUR	PLACEBO	KROPPSTEMPERATUR
0		✓	✓	✓	✓		✓
1	✓					✓	
2	✓					✓	
3	✓					✓	
4	✓					✓	
5	✓		✓			✓	✓
6	✓					✓	
7	✓					✓	
8	✓					✓	
9	✓		✓		✓	✓	✓
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓/	✓
11	✓		✓		✓	✓	✓
12	✓		✓		✓	✓	✓
13	✓		✓			✓	✓
14	✓	✓	✓	✓		✓	✓
15	✓		✓		✓	✓	✓
16	✓		✓			✓	✓
17	✓		✓			✓	✓
18			✓				✓
19			✓		✓		✓
20			✓				✓
21		✓	✓	✓	✓		✓

35

<sup>1</sup>Fullstendige blodtelling, <sup>2</sup>"California Mastitis Test",  
<sup>3</sup>Telling av somatiske celler, <sup>4</sup>Tilført ved hjelp av HMS

Alle kuene ble observert to ganger daglig (formiddag og ettermiddag), og unormale kliniske observasjoner (dvs. appetitt, tegn på betennelse, vandring, holdning, etc.) ble registrert. Kuene fikk sine jur undersøkt én gang daglig (om formiddagen) under hele undersøkelsesperioden, idet unormale funn ble registrert. Alle injeksjoner av test- og kontrollpreparater ble administrert mellom kl. 8 om morgenen og kl. 10 om formiddagen. Kuene ble melket to ganger daglig, og all melken ble kastet. Ingen andre medisineringer ble administrert under undersøkelsesperioden.

Utfordringen besto i en innsprøyting i melkekjertelen av en virulent kultur av *E. coli* i 1/4 av juret. Utfordringen ble titrert før oppstartingen av undersøkelsen for å gi middels sykelighet.

Kuene ble holdt inntil dag 31 (14 dager etter den siste G-CSF-dose) og så solgt for slakting. Alle kuene som døde under undersøkelsen, ble obdusert og kassert.

Sammenligninger mellom kontroll- og behandlingsgruppene ble gjort med hensyn på effektiviteten av G-CSF når det gjelder å forhindre kuer fra å utvikle koliform jurbetennelse på grunn av utfordring i melkekjertelen med *E. coli*. Resultatene er fremlagt grafisk i figurene 24 - 26. Resultatene av melkekulturbedømmelser (1=1-100 *E. coli*-kolonier, 2=100-500 *E. coli*-kolonier, 3=mer enn 500 *E. coli*-kolonier) (figur 24), kliniske bedømmelser som er en kombinasjon av melkebedømmelser (0=normal melk, 1=vannaktig klumpet, 2=mer vannaktig/klumpet, 3=svært vannaktig/klumpet) og jurbedømmelser (0=normal, 1=svak svelling/hardhet, 2=middels svelling/hardhet, 3=alvorlig svelling/hardhet) (figur 25) og "California Mastitis Test"-bedømmelser (CMT-bedømmelser) (negativ og spor = 0), viser at behandling med G-CSF under de ovenfor beskrevne forsøksbetingelser var svært effektiv når det gjelder å minske alvorligheten og øke tilfriskningen av lakterende melkekuer. En effektiv jurbetennelsebehandlingsmengde ble således påvist å være 3 µg/kg.

Hemogramendringer hos lakterende melkekuer som var gitt granulocyttkolonistimulerende faktor etter induksjon av koliform jurbetennelse (E. coli)

5 Det opprinnelige formål med denne undersøkelse var å bestemme om behandling med G-CSF ville fremskynde tilfriskning fra en eksperimentelt induisert jurbetennelse. Inokuleringene som ble gitt ved dette forsøket, resulterte ikke i signifikante kliniske tegn, og alle kuene ble kvitt  
10 infeksjonen i løpet av 24 timer etter inokulasjon. Følgelig kunne det terapeutiske potensial til G-CSF ikke evalueres. Det endelig formål med denne undersøkelse var å evaluere de hematologiske endringer induisert ved hjelp av human G-CSF ved en dose på 3 µg/kg på bovint perifert blod.

15 8 friske Holstein-kuer i den andre halvdel av laktasjonen ble infisert med en inokulasjon i melkekjertelen av et isolat av E. coli. Et jurbetennelseutvunnet isolat av E. coli dyrket i 14-16 timer i tryptocasesoya-dyrkningsvæske, ble brukt. 4 av kuene ble gitt G-CSF, de gjenværende  
20 4 utgjorde en infisert kontrollgruppe.

En innledende inokulasjon i melkekjertelen med 803,7 CFU ble gitt i den høyre bakre fjerdedel. Dette induserte ikke en klinisk jurbetennelse. En andre og en tredje inokulasjon med hhv. 44.000 CFU og 842.000 CFU ble  
25 gitt 2 dager senere og med 6 timers mellomrom. Den venstre bakre fjerdedel ble brukt til den andre og den tredje inokulasjon. Tid null ble satt til tidspunktet for den andre inokulasjon.

30 4 av disse 8 kuene ble tilfeldig valgt ut og injisert subkutant med human G-CSF omtrent 6 timer etter inokulasjon. En enkel injeksjon ble gitt til hver av disse kuene etter kveldsmelkingen i de neste 4 dager. Den gitte dose var 3 µg/kg hver gang. De gjenværende 4 kuer utfordret med E. coli, fikk ingen behandling.

35 Grunnhematologi ble fremskaffet på 3 på hverandre følgende dager med forbehandling og på dagene 0-12 etter inokulasjon med E. coli. Blodprøver ble tatt fra halevenen

og overført til prøverør som inneholdt EDTA.

Hemogrammet omfattet bestemmelser av totalt antall hvite blodlegemer (WBC), en differanse-celletelling, totalt antall røde blodlegemer (RBC), et pakket cellevolum (PCV) og plasmaprotein (PlPr). Alle prøvene ble bearbeidet innen 3 timer etter at de var tatt, og differanser ble utført på Wright Giemsa-fargede preparater. Tellinger av røde og hvite blodlegemer ble gjort under anvendelse av en Coulter-teller modell F.

Ingen av kuene utviste systemiske tegn på sykdom under forsøket. Omtrent 6 timer etter inokulasjon ble den infiserte fjerdedel hos noen av kuene oppsvulmet, rød og fast. Svelling i fjerdedelene hos disse kuene var bare svak etter 12 timer.

Hemogrammer av de 4 kuene som var gitt G-CSF, var kjennetegnet ved en middels leukocytose innen 24 timer fra den første injeksjon. Den konstaterte leukocytose besto hovedsakelig av fullt utviklede, ikke-toksiske neutrofiler. Innen den andre behandlingsdag ble det sett bånd-neutrofiler i det perifere blod. Den største venstreskifting var  $2,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$  bånd observert hos ku nr. 768. Tidspunktet da det maksimale venstre skift oppsto, svarte til tidspunktet da de segmenterte neutrofiler nådde sine høyeste verdier. Doseintervallene var tilstrekkelig korte til å resultere i en tilleggseffekt av legemidlet på neutrofilantall, som ikke vendte tilbake til grunnivåer mellom injeksjonene. Når injeksjonene opphørte, avtok celletallet med en lignende verdi som økningsverdien.

Rundt dag 7 falt tellingene til et nivå som var ca. 2-3 ganger grunnverdien, og de forble på dette nivå resten av behandlingsperioden.

Maksimale totale tellinger av hvite blodlegemer og tellinger av segmenterte neutrofiler ble iaktatt rundt dag 5. Den følgende tabell viser disse celletellingene for de behandlede og ubehandlede grupper på dag 0 og dag 5. Størrelsen på endringen (%) i celletellingene mellom dag 0 og 5 er vist bare for behandlingsgruppen.

UBEHANDLETTELLINGER ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )

5	Ku nr.	Dag 0		Dag 5	
		Seg	WBC	Seg	WBC
	326	3,8	11,6	2,5	8,8
10	801	2,9	8,3	2,4	7,4
	574	4,4	11,1	1,9	6,8
	825	3,5	10,2	2,8	8,3

15

G-CSF-BEHANDLETTELLINGER ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )

20	Ku nr.	Dag 0		Dag 5		% økning	
		Seg	WBC	Seg	WBC	Seg(%)	WBC(%)
25	768	2,9	11,7	8,9	21,2	300	180
	767	4,7	10,4	21,5	28,44	500	270
	773	4,2	11	22,6	32,3	500	290
	324	4,6	10,3	21,8	32,6	500	320

30

Den ubehandlede gruppe hadde ikke-signifikante endringer i celletellingene mellom dagene 0 og 5. Den behandlede gruppe hadde 3-5 ganger økninger i sine neutrofil-tellinger og 2-3 ganger økninger i sine WBC-tellinger.

35

Noen av kuene (326, 801, 574, 825, 767 og 768) hadde en liten reduksjon i sin WBC-telling 6 timer etter inokulasjon.

Ku nr. 324 i den behandlede gruppe hadde en høy normal WBC og PlPr, og en lav normal PCV, før og under forsøket. Disse lab-unormaliteter sammen med en mild slimmaterieholdig nasal utflod tydet på en kronisk sykdomsprosess. Interessant nok hadde denne kuen den største økning i neutrofil-tall (500%) med den minste maksimale venstreskifting (<400/ $\mu$ l).

Det var ingen endringer i antallet av de andre hvite blodlegemene hos de behandlede og ubehandlede kuer under forsøket. Heller ikke ble noen endringer observert i parametre for røde blodlegemer eller plasmaprotein i noen av gruppene.

Det konkluderes med at:

1. Human G-CSF stimulerer bovin neutrofil granulopoiese.
2. Human G-CSF gitt daglig ved en dose på 3  $\mu$ g/kg, forårsaker en 3-5 ganger økning i segmenterte neutrofiler etter 4 dager med bare en liten venstreskifting.
3. En mild eksperimentelt induisert jurbetennelse i en fjerdedel forringer ikke benmargstimulering ved hjelp av G-CSF.

De følgende forsøk ble utformet for å bestemme om G-CSF-behandling kunne forhindre dødelighet hos dyremodeller med infeksjons sykdom.

#### HAMSTERMODELL AV PSEUDOMONAS AERUGINOSA LUNGBETENNELSE

##### Bakterier

Stammen av *P. aeruginosa*, PAO2, som ble brukt i disse forsøkene, ble isolert fra blodet til en menneske-pasient med en abdominal infeksjon. PAO2 ble dyrket inntil eksponensiell vekst i trypticasesoya-dyrkningsvæske (TSB), og aliquoter av denne kultur ble så lagret nedfryst ved  $-70^{\circ}\text{C}$  i 40% glycerol inntil de ble brukt. 1,5 ml aliquoter av PAO2 ble opptiint, tilsatt til 50 ml TSB og inkubert i 4 timer i rystekolber ved  $37^{\circ}\text{C}$ . Logfase-organismer ble innhøstet ved sentrifugering ved 2000 x g, vasket to ganger med steril 0,9% saltoppløsning og på nytt oppslemmet til den ønskede

· konsentrasjon som bestemt spektrofotometrisk. Alle bakterielle inokula ble bekreftet ved hjelp av kvantitative kulturer under anvendelse av et spiral-utplatingsinstrument.

5 Dyr

Virusantistoff-frie hunnhamstere av type Golden Syrian som veide 80-100 g, ble erholdt fra Charles River, Canada (Quebec) og satt i karantene i 5 dager. Grupper à 5 dyr ble oppbevart i bur utstyrt med individuelle filterhetter. Dyrene fikk begrenset adgang til vann og et standard hamsterfôr inntil kvelden før infeksjon. Dyrene ble så fastet over natten. Human rekombinant granulocyttkolonistimulerende faktor (G-CSF) eller bærer (5% dextrose i sterilt vann) ble administrert subkutant i et totalt volum på 0,1 ml. Dyrene ble administrert med G-CSF eller bærer etter et to ganger daglig (tilbudt) program omtrent kl. 8 om morgenen og 3 om ettermiddagen. Injeksjoner av G-CSF ble fortsatt hos overlevende dyr i 3 dager etter infeksjon. Dyrene ble infisert mellom kl. 12 og 2 om ettermiddagen.

20 For intratrakeal inokulasjon ble hamstere bedøvet intraperitonealt med 75 mg/kg "Nembutal" (50 mg/ml). Dyrene ble plassert på et 30 grader skråttstilt brett, kjevne ble åpnet, og 0,25 ml av bakteriesuspensjonen ble administrert i luftrøret under anvendelse av en bøyd nål av størrelse 22 med en avrundet spiss som var 6,4 cm lang. Etter bakterieinokulasjon ble dyrene forsiktig rystet i 15 sekunder for å fordele inokulumet. Dyrene fikk komme seg fra bedøvelsen på varmeputer ved 37°C. Bare dyr som kom seg etter bedøvelsen, ble brukt i forsøket. Dyrene ble observert regelmessig. Dyrene som utviste symptomer på ekstrem sykелighet (manglende evne til å gå eller forbli oppstående), ble avlivet av en observatør med bind for øynene og tellet som død.

35 Bruken av G-CSF som et profylaktisk/terapeutisk middel for forhindring av bakteriell lungebetennelse hos hamstere

Formålet med dette forsøk var å bestemme virknings-

fullheten av forskjellige doser av G-CSF når det gjelder å forhindre en fatal luftveisinfeksjon forårsaket av *Pseudomonas aeruginosa*. Gruppene var som følger (15 hamstere/gruppe):

Gruppe 1: Infisert, ikke-medisinert (bare bærer)

Gruppe 2: Infisert, medisinert med G-CSF,  
5 µg/kg tilbudt

Gruppe 3: Infisert, medisinert med G-CSF,  
15 µg/kg tilbudt

Gruppe 4: Infisert, medisinert med G-CSF,  
50 µg/kg tilbudt

Dosering av dyrene ble påbegynt på dagen før bakterieutfordring. Dyrene mottok således 3 doser før infeksjon, og overlevende dyr fortsatte å få G-CSF tilbudt. Omtrent  $5 \times 10^7$  kolonidannende enheter (CFU) av PAO2 ble administrert til hver hamster. Figur 27 viser den relative dødelighet i hver gruppe med tiden. Alle tre gruppene av hamstere som fikk G-CSF, hadde signifikant lavere dødelighet enn de dyrene som bare fikk bærer.

Det var en signifikant behandlingseffekt ( $p < 0,001$ ) for alle gruppene ved "Log Rank Chi Square Analysis". Hamstere forbehandlet med G-CSF, 5 µg/kg tilbudt, før infeksjon, hadde ikke en signifikant redusert dødelighetsrate sammenlignet med kontrolldyr. Dyrene som var forbehandlet med 15 µg/kg G-CSF tilbudt, adskilte seg imidlertid signifikant fra kontrollene ( $p < 0,001$ ). Dyrene som fikk 50 µg/kg tilbudt G-CSF, hadde også signifikant redusert dødelighet ( $p < 0,001$ ). De 15 µg/kg tilbudte og 50 µg/kg tilbudte doser var ikke signifikant forskjellige fra hverandre.

Effekt av G-CSF doseringsplan på dødelighetsrate hos hamstere med en lungeinfeksjon av *Pseudomonas aeruginosa*

Formålet med dette forsøket var å bestemme den tid som var påkrevet mellom påbegynnelse av G-CSF-behandling og infektøs utfordring for å bevirke redusert dødelighet.

Gruppe 1: Infisert, ikke-medisinert (bare bærer)

Gruppe 2: Infisert, medisinert med 15 µg/kg tilbudt, påbegynt omtrent 30 timer før infeksjon. Dyrene fikk 3 doser G-CSF før utfordring.

Gruppe 3: Infisert, medisinert med 15 µg/kg tilbudt, påbegynt 5 timer før utfordring.

Dyrene fikk omtrent  $5 \times 10^7$  CFU PAO2 intratrakealt. Dosering med G-CSF fortsatte på tilbudsplanen i 3,5 dager på overlevende dyr. Figur 28 viser dødeligheten med tiden i alle gruppene med dyr. Begge medisinerte grupper hadde signifikant redusert dødelighet sammenlignet med ikke-medisinerte dyr.

Det var en signifikant behandlingseffekt ( $p < 0,001$ ) for alle gruppene ved "Log Rank Chi Square Analysis". Hamstere forbehandlet 5 timer før infeksjon, hadde en signifikant redusert dødelighet ( $p < 0,001$ ) sammenlignet med kontrolldyr. Hamstere forbehandlet 30 timer før infeksjon, var også signifikant forskjellige ( $p < 0,001$ ) fra kontrolldyrene.

Rottmodell med bedømmelse i nyrebekken og nyre med *Candida albicans*

#### Organisme

Det kliniske isolat av *Candida albicans* som ble brukt ved dette forsøket, ble erholdt på Sabouraud dextrose-skrå-agarer. *C. albicans* ble dyrket over natten i Sabouraud dextrosevæske. *C. albicans* ble isolert ved sentrifugering ved  $2000 \times g$  i 10 minutter ved  $4^{\circ}C$ . Pelleten ble vasket to ganger med fosfatbufret saltoppløsning (PBS), på nytt oppslemmet i PBS og regulert til den ønskede konsentrasjon etter opptelling under anvendelse av et hemocytometer. Alle inokula ble bekreftet ved hjelp av kvantitative kulturer.

#### Dyr

Hunnrotter av type Sprague-Dawley som veide 150-200 g, ble satt i karantene i 5 dager. Grupper på 4 dyr ble oppbevart i bur som hang i wire, og fikk ubegrenet adgang til standard rottefôr og vann. Dyrene fikk G-CSF og bærer

(PBS) to ganger daglig, idet man begynte dagen før infeksjonsutfordring. Overlevende dyr fortsatte å få G-CSF eller bærer tilbudt i 10 dager.

For intravenøs inokulasjon ble rottene bedøvet med ether. Et 0,1 ml volum *C. albicans* ble injisert i halevenen.

Gruppe 1: Infisert, ikke-medisinert (bare bærer)

Gruppe 2: Infisert, medisinert med G-CSF,

50 µg/kg tilbudt

Man begynte omtrent 30 timer før infeksjon.

Figur 29 viser dødeligheten med tiden i hver gruppe av dyr. Dyrene fikk  $1,3 \times 10^6$  CFU *C. albicans*. Det var ingen dødsfall i gruppen som fikk G-CSF.

Det var en signifikant behandlingseffekt ( $p < 0,01$ ) for alle grupper ved "Log Rank Chi Square Analysis". G-CSF-forbehandlede dyr hadde en signifikant redusert dødelighetsrate sammenlignet med kontrolldyr ( $p < 0,001$ ). Rotter behandlet med G-CSF etter infeksjon, adskilte seg ikke signifikant fra kontrollene.

G-CSF administrert til voksende griser

Bovin G-CSF ble administrert til voksende griser (~30 kg) på følgende måte:

Dosering = 5 µg/kg kroppsvekt/dag

Vei: subkutan

n = 6 griser

Neutrofilnivåene var som vist nedenunder:

<u>Dag</u>	<u>Neutrofiler (gjennomsnitt)</u>
0	3108
2	29922
4	24595
6	42713

Ved en undersøkelse på 6 normale, voksende griser økte neutrofilnivåene dramatisk innen 2 dager og nådde et

13 ganger høyere nivå etter 6 dager med daglig administrering.

G-CSF administrert til normale nyfødte føll

Bovin G-CSF ble administrert til normale nyfødte føll på følgende måte idet man startet da de var 1 dag gamle:

Dosering = 10 og 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  kroppsvekt/dag

Vei: intramuskulær

n = 5 føll

Dag 0 = dag før den første G-CSF-administrering

Neutrofilnivået var som vist nedenunder:

Føll nr.	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Neutrofilantall					
		Dag 0	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
1	20	4950	17473	28072	35524	30874	38263
2	10	6708	16195	27807	28560	26960	26535
3	10	5016	10472	6715	16112	19975	16464
4	10	6480	6225	4400	5610	10332	15372
5	10	9156	10406	11692	11304	13588	17300

Ved en undersøkelse av 5 nyfødte føll som ble gitt bovin G-CSF daglig, økte neutrofilnivåene opptil tre og en halv ganger i løpet av 24 timer, og opptil syv og en halv ganger etter 5 dager, avhengig av dosering.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for isolering og rensing av bovin eller  
5 human G-CSF fra en mikroorganisme som produserer bovin eller  
human G-CSF,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

1) mikroorganismen lyseres, og uoppløselig materiale  
som inneholder bovin eller human G-CSF, atskilles fra opp-  
10 løselig proteinholdig materiale,

2) det humane G-CSF-materiale ekstraheres med deoxy-  
cholat,

3) den bovine eller humane G-CSF oppløseliggjøres og  
oxyderes i nærvær av et denaturerende, oppløseliggjørende  
15 middel og et oxydasjonsmiddel,

4) det denaturerende, oppløseliggjørende middel  
fjernes fra den bovine eller humane G-CSF,

5) den bovine G-CSF underkastes kationbytterkromato-  
grafi eller den humane G-CSF underkastes anionbytterkromato-  
20 grafi etterfulgt av kationbytterkromatografi, og

6) rensed bovin G-CSF utvinnes ved å eluere kation-  
bytterkromatografikolonnen med en acetatbuffer som inneholder  
125-175 mM natriumklorid ved en pH-verdi på ca. 5,4, eller  
human G-CSF utvinnes ved å eluere anionbytterkolonnen med en  
25 tris-buffer som inneholder 35-45 mM natriumklorid ved en  
pH-verdi på ca. 7,7, etterfulgt av eluering av kationbytter-  
kolonnen med en acetatbuffer som inneholder 35-40 mM natrium-  
klorid ved en pH-verdi på ca. 5,4.

30 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det denaturerende, opp-  
løseliggjørende middel er "Sarkosyl".

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,  
35 k a r a k t e r i s e r t v e d a t oxydasjonsmidlet er  
CuSO<sub>4</sub>.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det denaturerende, opp-  
løseliggjørende middel fjernes ved å bruke "Dowex".

5

10

15

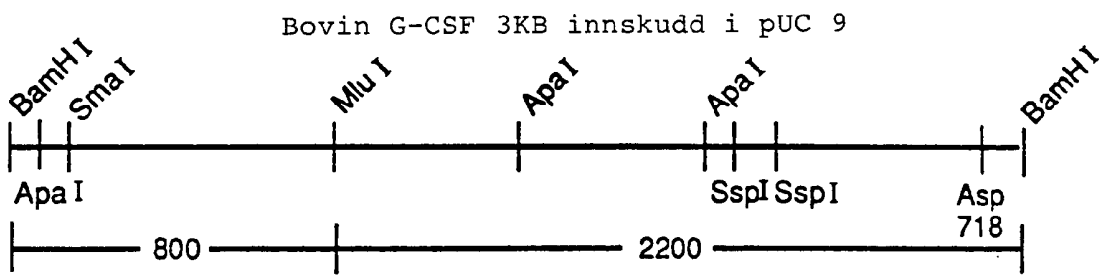
20

25

30

35

FIG. 1



bovin G-CSF-sekvens  
bgcsf.dna

1 ACCCCCCCTTG GCCCTGCCCG ATCCCTGCCC CAGAGCTTCC TGCTCAAGTG  
51 CTTAGAGCAA CTGAGGAAA TCCAGGCTGA TGGGGCCGAG CTGCAGGAGA  
101 GGCTGTGTGC CGCCCACAAG CTGTGCCACC CGGAGGAGCT GATGCTGCTC  
151 AGGCACTCTC TGGGCATCCC CCAGGCTCCC CTAAGCAGCT CCTCCAGCCA  
201 GTCCCCTGCAG CTGGCAGGCT GCCTGAACCA ACTACACGGC GGCCTCTTTC  
251 TCTACCAGGG CCTCCTGCAG GCCCTGGCGG GCATCTCCCC AGAGCTGGCC  
301 CCCACCTTGG ACACACTCCA GCTGGACGTC ACTGACTTTG CCACGAACAT  
351 CTGGCTGCAG ATGGAGGACC TGGGGGGCGC CCCCCTGTG CAGCCCACCC  
401 AGGCGCCCAT GCCGACCTTC ACTTCAGCCT TCCAACCCAG AGCAGGAGGG  
451 GTCCTGGTTG CTTCCCAGCT GCATCGTTTC CTGGAGCTGG CATACCGTGG  
501 CCTGGGCTAC CTTGCTGAGC CCTGA

FIG. 2-A

300217

1 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
46 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu  
91 Leu Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu  
136 Glu Leu Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro  
181 Leu Ser Ser Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Arg Gly Cys Leu  
226 Asn Gln Leu His Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln  
271 Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr  
316 Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln  
361 Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly  
406 Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly  
451 Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe Leu Glu Leu Ala Tyr  
496 Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro End

FIG. 2 -B

300217

GGGGACAGGCTTGAGAAATCCCAAAGGAGAGGGGCAAGGACACTGCCCCGGCAAGTCTGCCAGAGCAGAGAGGGAGACCCCGACTCAGCTGCCACTTCCC 100  
 CACAGGCTCGTCCGCTCCAGGGGCTATCAGGGGCTCAGGCTTTGTTCAGCTGTCTGTTCACACACTCTGGGGCCATTTCAGGCTGGGTGGGCAGC 200  
 GGGGGAAGGGAGTTTGGGGGGGCAAGGGGACGTCAAAGGGATCAGAGATTCCACAATTTCACAAAACCTTCGCAACAGCTTTTTGTTCACACCCC 300  
 CCTGCATTGCTTGGACACCAATTTGCATAATCTCGGAAGTTATTACTAAGCTTAGTGTGGCCCAAGTAATTTCTCCACAGGCTTCCATGGGGT 400  
 TAIGTATAAGGGCCCCCTAGAGCTGGGGCCCCAAAACAGCCCGAGGCTGCAGCCACCCAGACCCCATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCA 500  
 -20 -18  
 etLysLeuMeta  
 TGAAGCTGATGG  
 -30  
 MetaIaGlyProAlaThrGlnSerProM  
 TGGTGAAGTGTCTTGGCCAGGATGGGAGAGCCGCTTCCCTGGCATGGGAGGGAGGCTGGTGTGACAGAGGGGCTGGGATCCCCGTTCT 600  
 GGGATGGGGATTAAAGGCACCCAGTGTCCCCGAGAGGGCCCTCAGGTGGTAGGGAACAGCATGTCTCTGAGCCGCTCTGTCCCCACCCCTGCAGCTGC 700  
 -10 -1  
 +1 10 20  
 euLeuTrpHisSerAlaLeuTrpThrValGlnAlaThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysCysLeuGluGlnVa  
 TGCTGTGGCACAGTGCACCTGGACAGTGCAGGAGGCCACCCCTGGGCTTCCAGGCTCCCTGCCCAAGACTTCCTGTCAAGTCTTAGAGCAAGT 800  
 30 35  
 1ArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeu  
 GAGGAAGATCCAGGGGATGGCGCAGGCTCCAGGAGAGCTGTGAGTGGGTGGGTGAGAGGGCTGTGGAGGGGAGCCCGGTGGGAGAGGCTAAGGGG 900  
 GATGGAACTGCAGGGCCACAATCCCTCGAAGGGACATGGGAGATATTAGGAGCAGTGGAGCTGGGAAAGGCTGGGAAGGACTGGGGAGGGAGGACCT 1000  
 TGGTGGGACAGTGTCCGGAGGGCTGGCTGGGATGGGATGGGATCAGATTCAGGAGAAAGGGCAAGGGCCCTGTGAGATCAGAGATGGGGGTG 1100  
 CAGGGCAGAGAGGAACAGGCTGGCAGGACATGGAGGGAGGGGAAGACCAGAGAGTGGGGAGGACCCGGGAAGGAGCGGGCCCGCCACGGC 1200  
 36 40 50  
 CysAlaThrTyrLysLeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpA  
 GAGTCTCACTCAGCATCTTCCATCCCCAGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCCTGGG 1300  
 60 70 71  
 laProLeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeu  
 CTCCTGTAGCAGCTGCCACAGCCAGGCTGCAGCTGTGAGTGTGAGGAAGGATAGGCTAATGAGGAGGGGGGAGGAGAGGAAACCCCATGGG 1400

FIG. 3 -A



bGCSF dna

30  
TTC TAG AAA AAA CCA AGG AGG TAA ATA ATG ACT CCG CTG GGT CCG GCA CGT TCT CTG  
Phe End Lys Lys Pro Arg Arg End Ile Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu

60  
120  
CCG CAG TCT TTC CTG CTG AAA TGC CTG GAA CAG GTT CGT AAA ATC CAG GCT GAC GGT GCA  
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala

180  
GAG CTC CAG GAA CGT CTG TGC GCT GCG CAC AAA CTG TGC CAC CCG GAA GAG CTG ATG CTG  
Glu Leu Gln Gln Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met Leu

240  
CTC CGT CAC TCT CTG GGT ATC CCG CAG GCG CCG CTG TCT TCC TGC TCT TCC CAG TCT CTG  
Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys Ser Ser Gln Ser Leu

300  
CAG CTC CGT GGT TGC CTG AAC CAG CTC CAT GGT GGC CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTC  
Gln Leu Arg Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu

360  
CAA GCT TTG GCA GGT ATC TCT CCG GAA CTG GCT CCG ACC CTG GAC ACC CTG CAG CTC GAC  
Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp

420  
GTT ACC GAC TTC GCT ACC AAC ATC TGG CTG CAG ATG GAA GAT CTG GGT GCT GCA CCG GCG  
Val Thr Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro Ala

480  
GTT CAG CCG ACC CAG GGC GCT ATG CCG ACC TTC ACC TCT GCT TTC CAG CGT CGC GCT GGT  
Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly

540  
GGC GTT CTG GTA GCT TCT CAG CTG CAC CGT TTC CTC GAG CTG GCT TAC CGT GGT CTG CGT  
Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu Leu His Arg Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg

TAC CTG GCT GAA CCG TAA TAG GAT CC  
Tyr Leu Ala Glu Pro End End Asp

FIG. 4

300217

300217

bGCSF dna4

```

      10          20          30          40          50          60
CTAGAAAA AACCAAGGAG GTAATAAATA ATGACTOCGC TCGGCCCTGC ACGTTCCTGT
      TTTT TTGGTTCCCTC CATTATTTAT TACTGAGGCG AGCCGGGACG TGCAAGAGAC

      70          80          90          100         110         120
CCGCAGAGCT TCCTGDTGAA ATGCCTCGAA CAGGTTTCGTA AAATTCAGGC TGATGGTGCT
GGCGTCTCGA AGGACGACTT TACGGAGCTT GTCCAAGCAT TTTAAGTCCG ACTACCCACGA

      130         140         150         160         170         180
GAGCTCCAGG AGCGTCTGTG CGCTGCTCAC AAGCTCTGCC ACCCTGAAGA ACTCATGCTG
CTCGAGGTCC TCGCAGACAC GCGACGAGTG TTCGAGACGG TGGGACTTCT TGAGTACGAC

      190         200         210         220         230         240
CTCCGTCACT CTCTGGGGAT CCCGCAGGCG CCGCTGTCTT CTTGCTCCTC TCAGTCTCTG
GAGGCAGTGA GAGACCCCTA GGGCGTCCGC GCGCAGAGAA GAACGAGGAG AGTCAGAGAC

      250         260         270         280         290         300
CAACTCCGTG GTTGCCTGAA CCAGCTCCAT GGTGGCCTGT TCCTGTACCA GGGTCTCCTG
GTTGAGGCAC CAACGGACTT GGTGAGGTA CCACCGGACA AGGACATGGT CCCAGAGGAC

      310         320         330         340         350         360
CAAGCTTTGG CAGGCATCTC TCCGGAAGTC GCACCTACTC TCGATACTCT GCAGCTCGAC
GTTGGAACCC GTCCGTAGAG AGGCCTTGAG CGTGGATGAG AGCTATGAGA CGTCGAGCTG

      370         380         390         400         410         420
GTTACCGACT TCGCTACCAA CATTGGCTC CAGATGGGAG ATCTGGGCGC TGCACCGGCT
CAATGGCTGA AGCGATGGTT GTAAACCGAG GTCTACCTTC TAGACCCGCG ACGTGGCCGA

      430         440         450         460         470         480
GTTCAGCCGA CTCAGGGCGC TATGCCTACC TTCACCTCTG CTTTCCAGCG TCGTGCTGGT
CAAGTCGGCT GAGTCCCCTG ATACGGATGG AAGTGGAGAC GAAAGGTCCG AGCACGACCA

      490         500         510         520         530         540
GGTGTCTCTG TAGCTTCTCA GCTGCACCGT TTCCTCGAGC TGGCTTACCG TGGTCTGCGT
CCACAAGACC ATCGAAGAGT GACGTGGCA AAGGAGCTCG ACCGAATGGC ACCAGACGCA

      550         560
TACCTGGCTG AACCGTAATA G
ATGGACCGAC TTGGCATTAT CTAA

```

FIG. 5

300217

bGCSF dna<sup>4</sup>

bGCSF - underenhet I Xba1-HindIII

CTAGAAAAA 12 CCAAGGAGGT 22 AATAAATAAT 32 GACTCCGCTC 42 GCCCCTGCAC 52 GTTCTGCGC 62  
TTTTTT 12 GGTTCCTCCA 22 TTATTATTATA 32 CTGAGGCGAG 42 CCGGACGAG 52 CAAGAGACGG 62  
GCAGAGCTTC 72 CTGCTGAAT 82 GCCTCGAACA 92 GGTTCGTAATA 102 ATTCAGGCTG 112 ATGGTCTGA 122  
CGTCTCGAAG 132 GACGACTTTA 142 CGGAGCTTGT 152 CCAAGCATTT 162 TAAGTCCGAC 172 TACCACGACT 182  
GCTCCAGGAG 192 CGTCTGTGCC 202 CTGCTCACCAC 212 GCTCTGCCAC 222 CCTGAAGAAC 232 TCATGCTGCT 242  
CGAGGTCTC 252 GCAGACACGC 262 GACGAGTGT 272 CGAGACGGTG 282 GGACTTCTTG 292 AGTACGACGA 302  
CCGTCACCTC 192 CTGGGGATCC 202 CGCAGGCGCC 212 GCTGTCTTCT 222 TGCTCCTCTC 232 AGTCTCTGCA 242  
GGCAGTGAGA 252 GACCCCTAGG 262 GCGTCCGCGG 272 CGACAGAAGA 282 ACGAGGAGAG 292 TCAGAGACGT 302  
ACTCCGTTGG 252 TGCCCTGAACC 262 AGCTCCATGG 272 TGGCCCTGTC 282 CTGTACCAGG 292 GTCTCCCTGCA 302  
TGAGGCACCA 252 ACGGACTTGG 262 TCGAGGTACC 272 ACCGGACAAG 282 GACATGGTCC 292 CAGAGGACGT 302

TCGA

FIG. 6-A

**bGCSF dna4**                      **bGCSF - underenhet II**                      **HindIII-EcoRI**

```

312      322      332      342      352      362
AGCTTTGGCA GGCATCTCTC CGGAACTCBC ACCTACTCTC GATACTCTGC AGCTCGACGT
      AACCGT CCGTAGAGAG GCCTTGAGCG TGGATGAGAG CTATGAGACG TCGAGCTGCA

372      382      392      402      412      422
TACCGACTTC GCTACCAACA TTTGGCTCCA GATGGAAGAT CTGGCGCTG CACCGGCTGT
ATGGCTGAAG CGATGGTTGT AAACCGAGGT CTACCTTCTA GACCCGCGAC GTGGCCGACA

432      442      452      462      472      482
TCAGCCGACT CAGGGCGCTA TGCCCTACCTT CACCTCTGCT TTCCAGCGTC GTGCTGGTGG
AGTCGGCTGA GTCCCGCGAT ACGGATGGAA GTGGAGACGA AAGGTCGCAG CACGACCCACC

492      502      512      522      532      542
TGTTCTGGTA GCTTCTCAGC TGCACCGTTT CCTCGAGCTG GCTTACCGTG GTCTGCGTTA
ACAAGACCAT CGAAGAGTCC ACGTGGCAAA GGAGCTCGAC CGAATGGCAC CAGACGCAAT

552      562
CCTGGCTGAA CCGTAATAG
GGACCGACTT GGCATTATCT TAA

```

FIG. 6-B

bGCSF dna4

```

      30          60
C TAG AAA AAA CCA AGG TAA TAA ATA ATG ACT CCG CTC GGC CCT GCA CGT TCT CTG
  Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu

      90          120
CCG CAG AGC TTC CTG AAA TGC CTC GAA CAG GTT CGT AAA ATT CAG GCT GAT GGT GCT
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala

      150          180
GAG CTC CAG GAG CGT CTG TGC GCT GCT CAC AAG CTC TGC CAC CCT GAA GAA CTC ATG CTG
Glu Leu Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met Leu

      210          240
CTC CGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG CAG GCG CCG CTG TCT TCT TGC TCC TCT CAG TCT CTG
Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys Ser Ser Gln Ser Leu

      270          300
CAA CTC CGT GGT TGC CTG AAC CAG CTC CAT GGT GGC CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTC CTG
Gln Leu Arg Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu

      330          360
CAA GCT TTG GCA GGC ATC TCT CCG GAA CTC GCA CCT ACT CTC GAT ACT CTG CAG CTC GAC
Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp

      390          420
GTT ACC GAC TTC GCT ACC AAC ATT TGG CTC CAG ATG GAA GAT CTG GGC GCT GCA CCG GCT
Val Thr Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro Ala

      450          480
GTT CAG CCG ACT CAG GGC GCT ATG CCT ACC TTC ACC TCT GCT TTC CAG CGT GCT GGT GGT
Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly

      510          540
GGT GTT CTG GTA GCT TCT CAG CTG CAC CGT TTC CTC GAG CTG GCT TAC CGT GGT CTG CGT
Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg

TAC CTG GCT GAA CCG TAA TAG AAT TC
Tyr Leu Ala Glu Pro End End
```

FIG. 7

300217

FIG 8

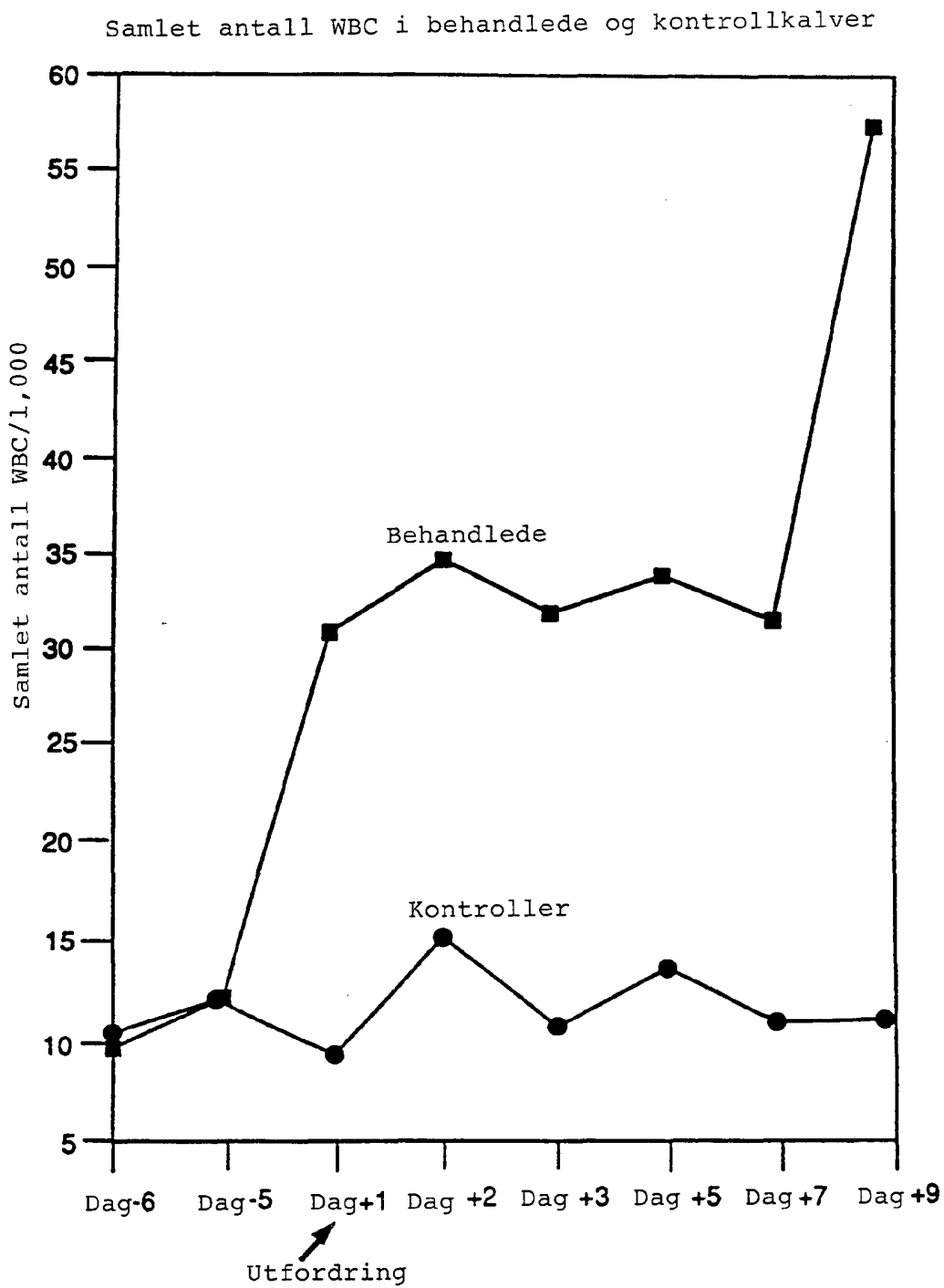


FIG. 9

Samlet antall neutrofiler i behandlede og kontrollkalver

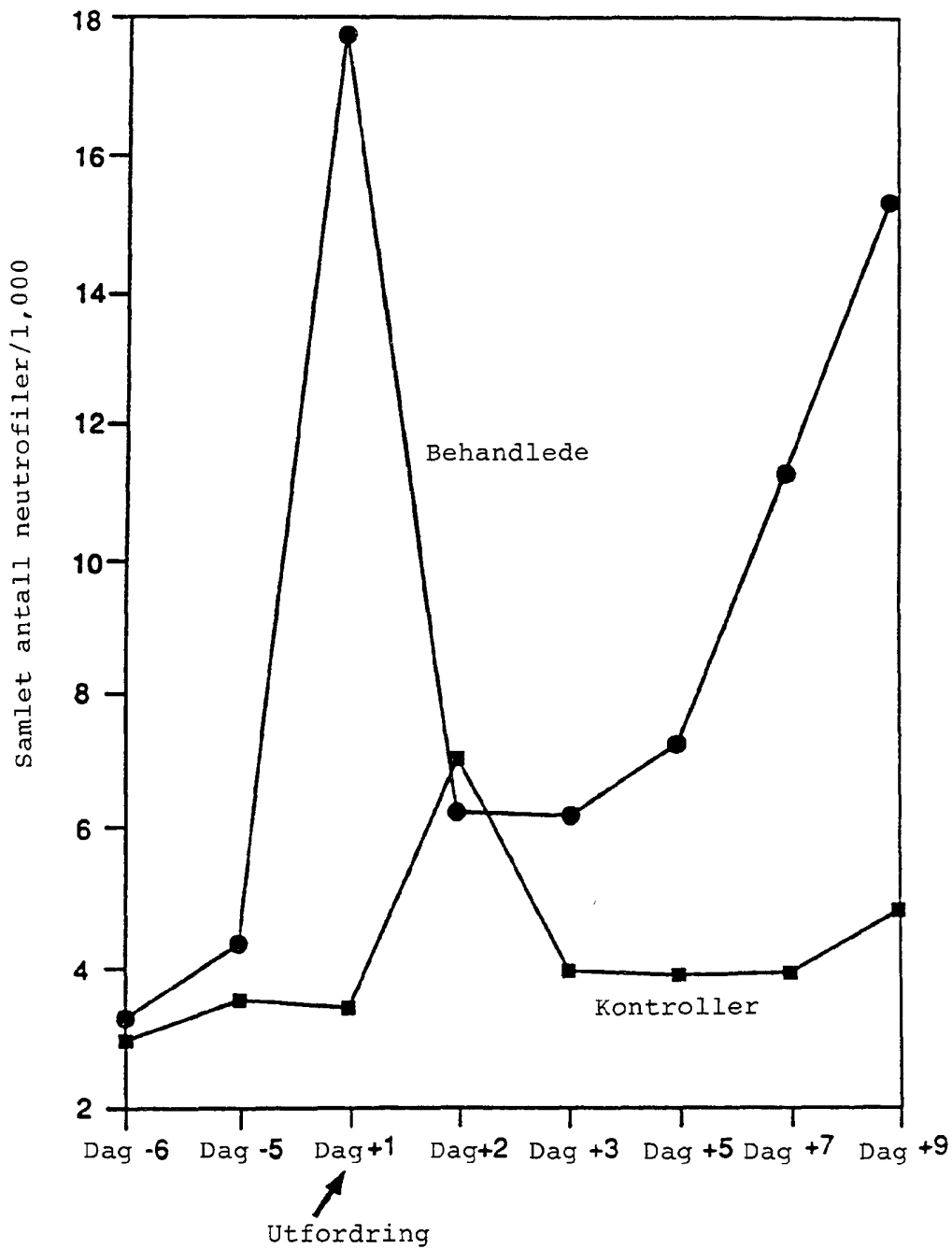


FIG. 10

Samlet antall bånd hos behandlede og kontrollkalver

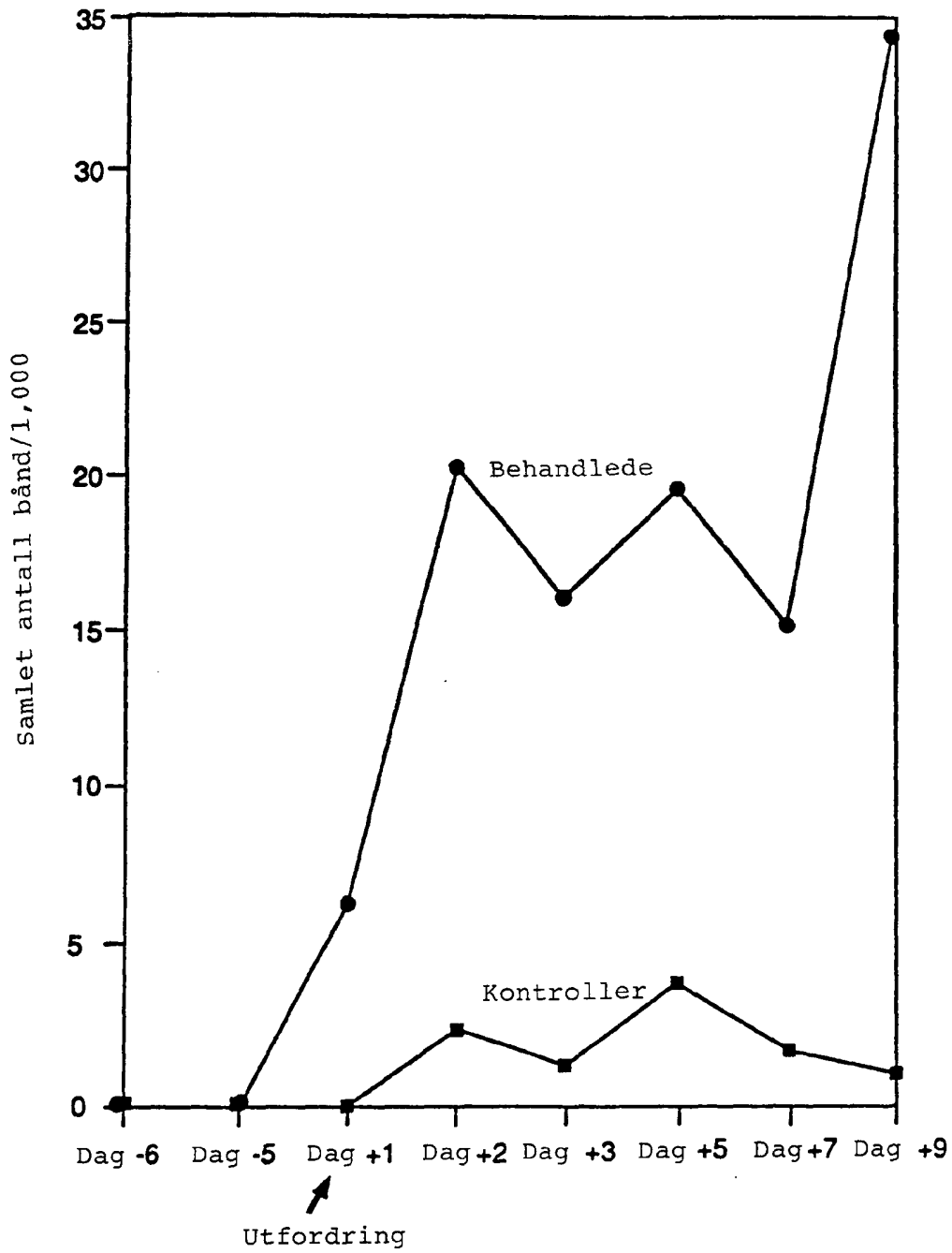


FIG. 11

Daglige sykkelighetspoeng

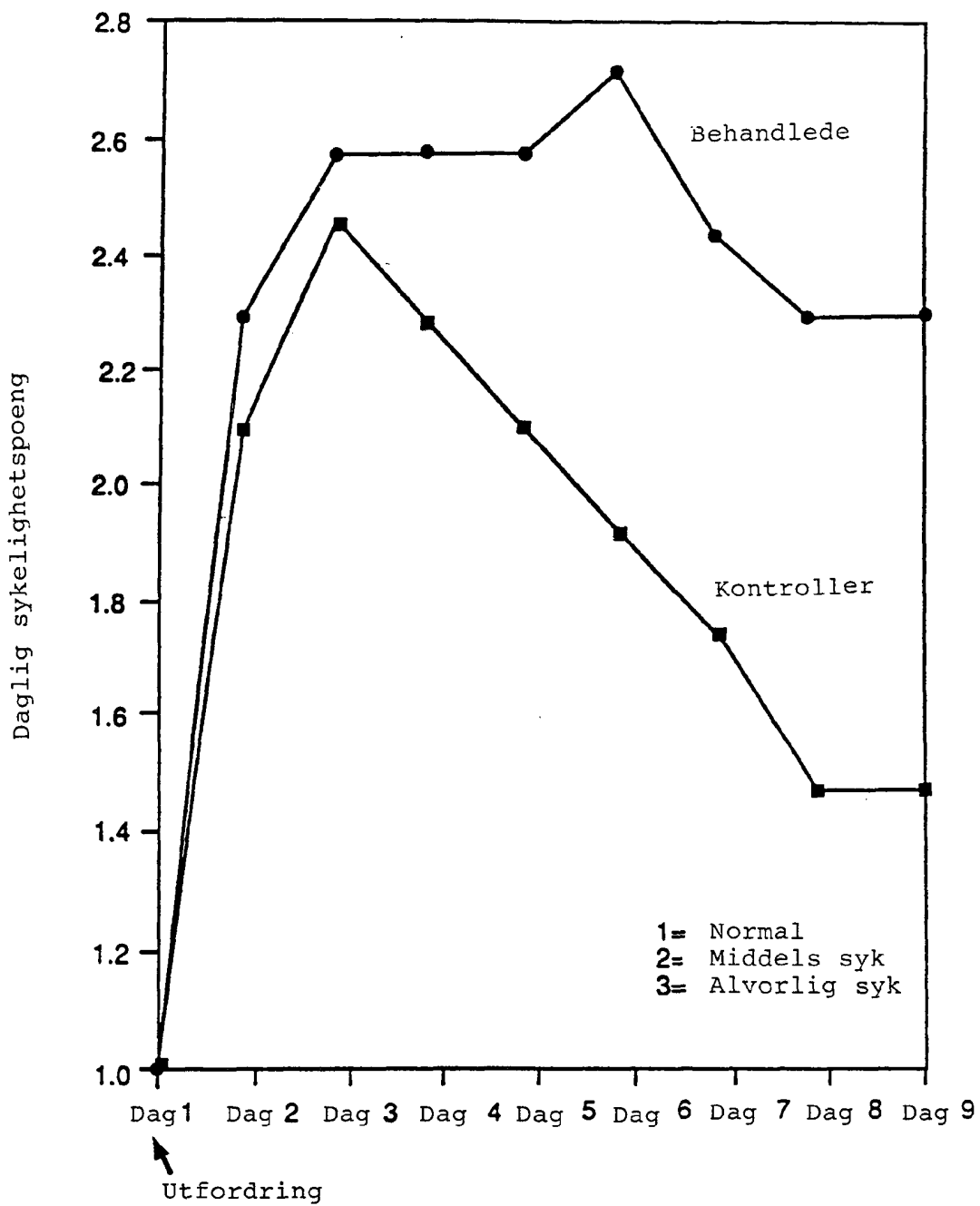


FIG. 12

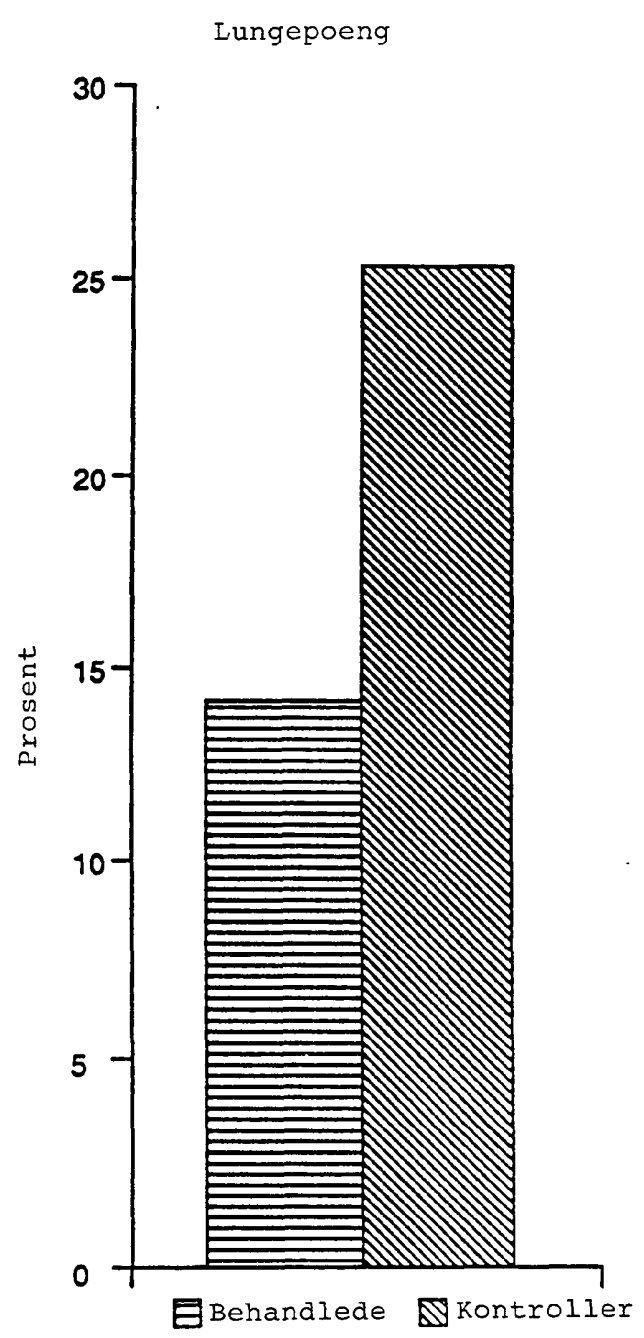


FIG. 13

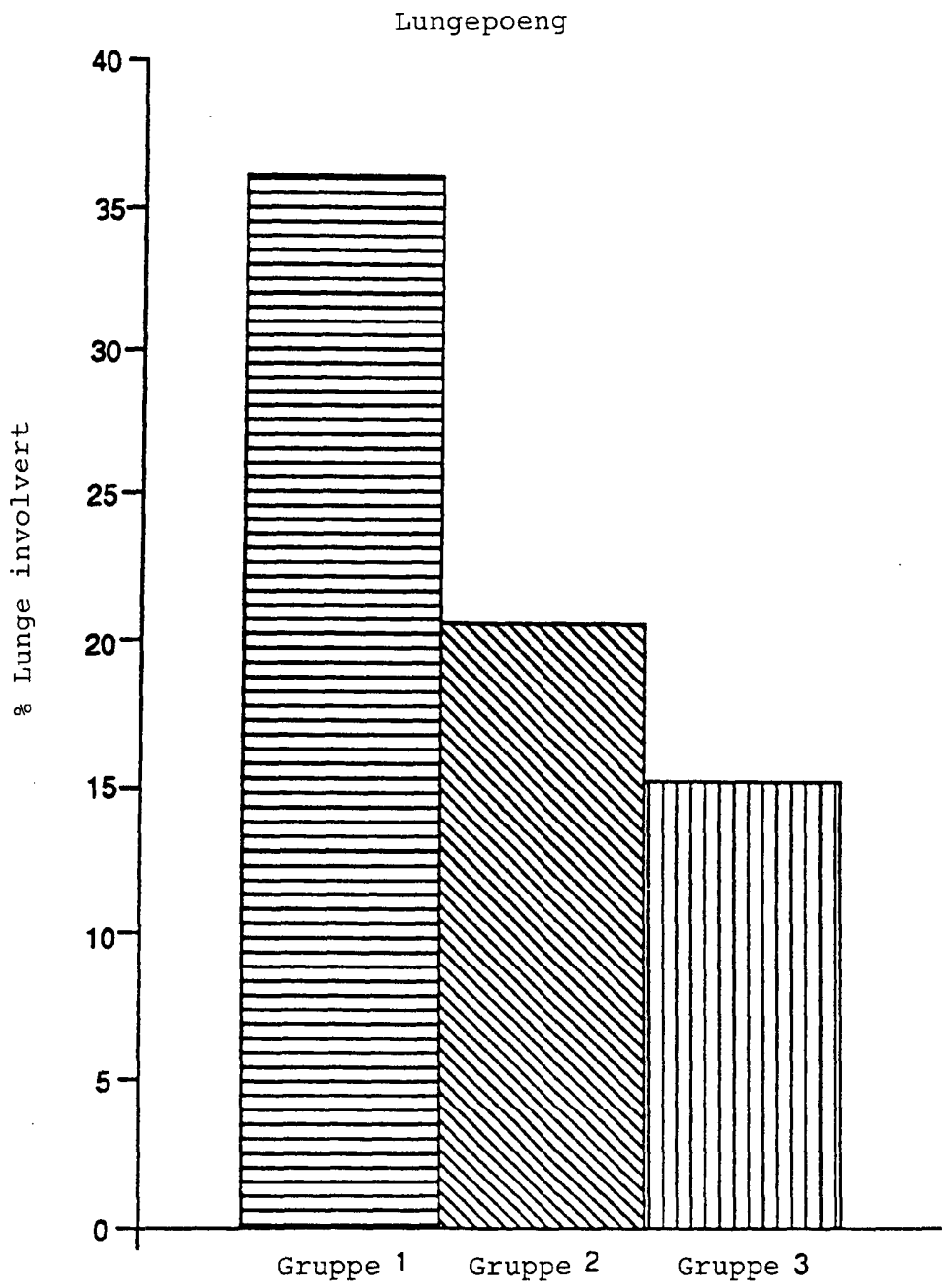


FIG. 14

Daglige sykkelighetspoeng

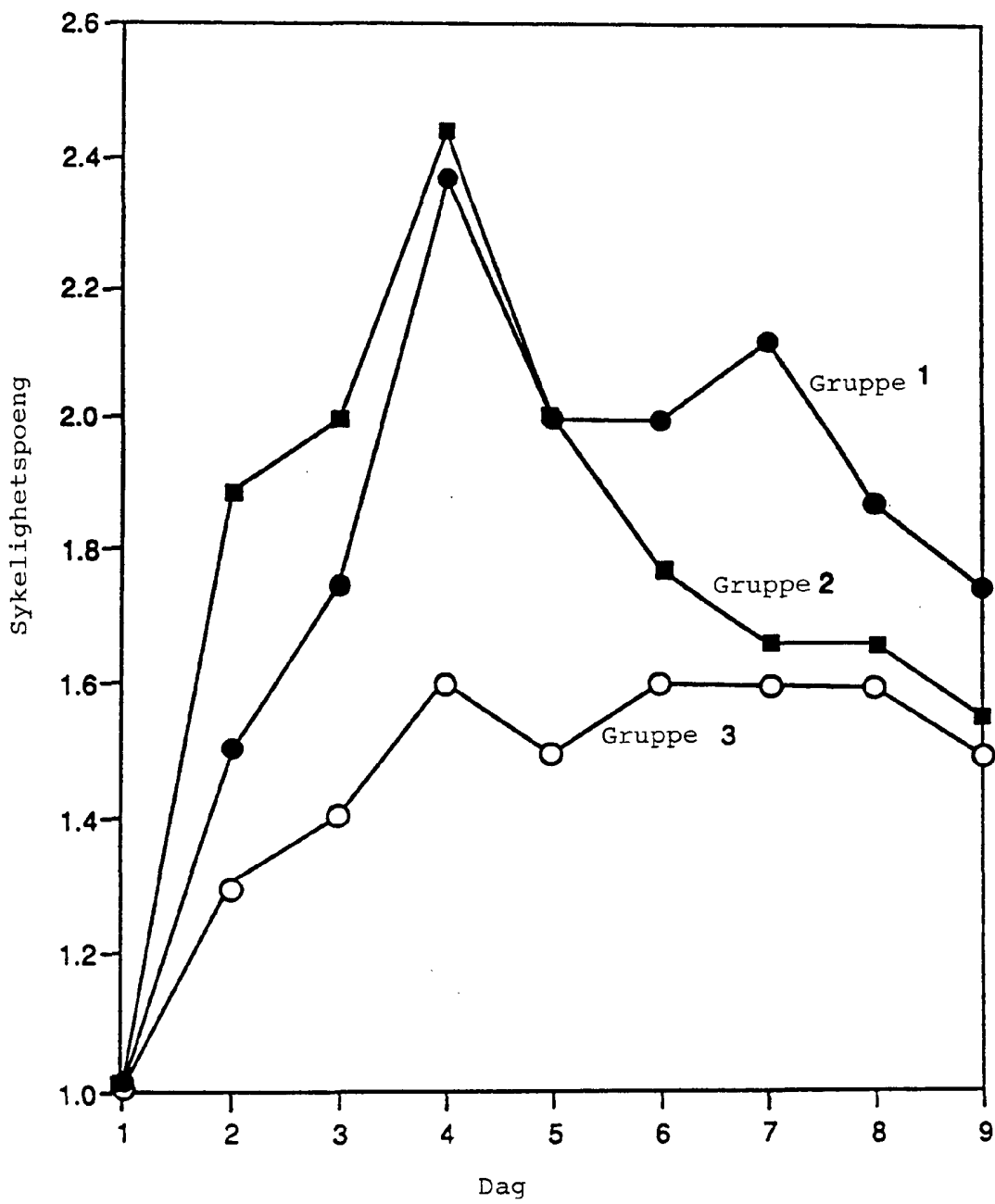


FIG. 15

Samlet antall WBC-er for dagene 1,2,5 og 9 etter utfordring

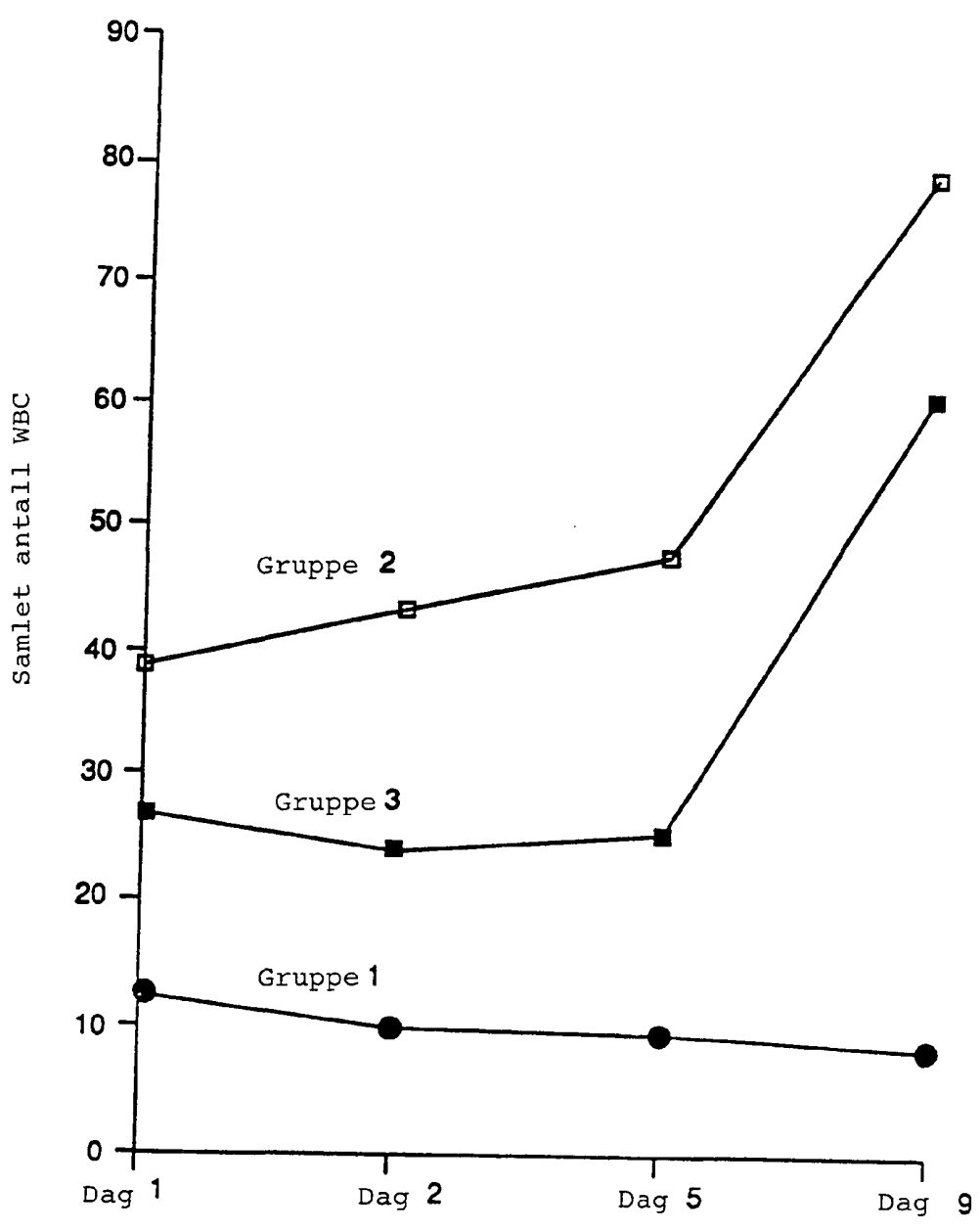


FIG. 16

Samlet antall PMN-er for dagene 1,2,5 og 9 etter utfordring

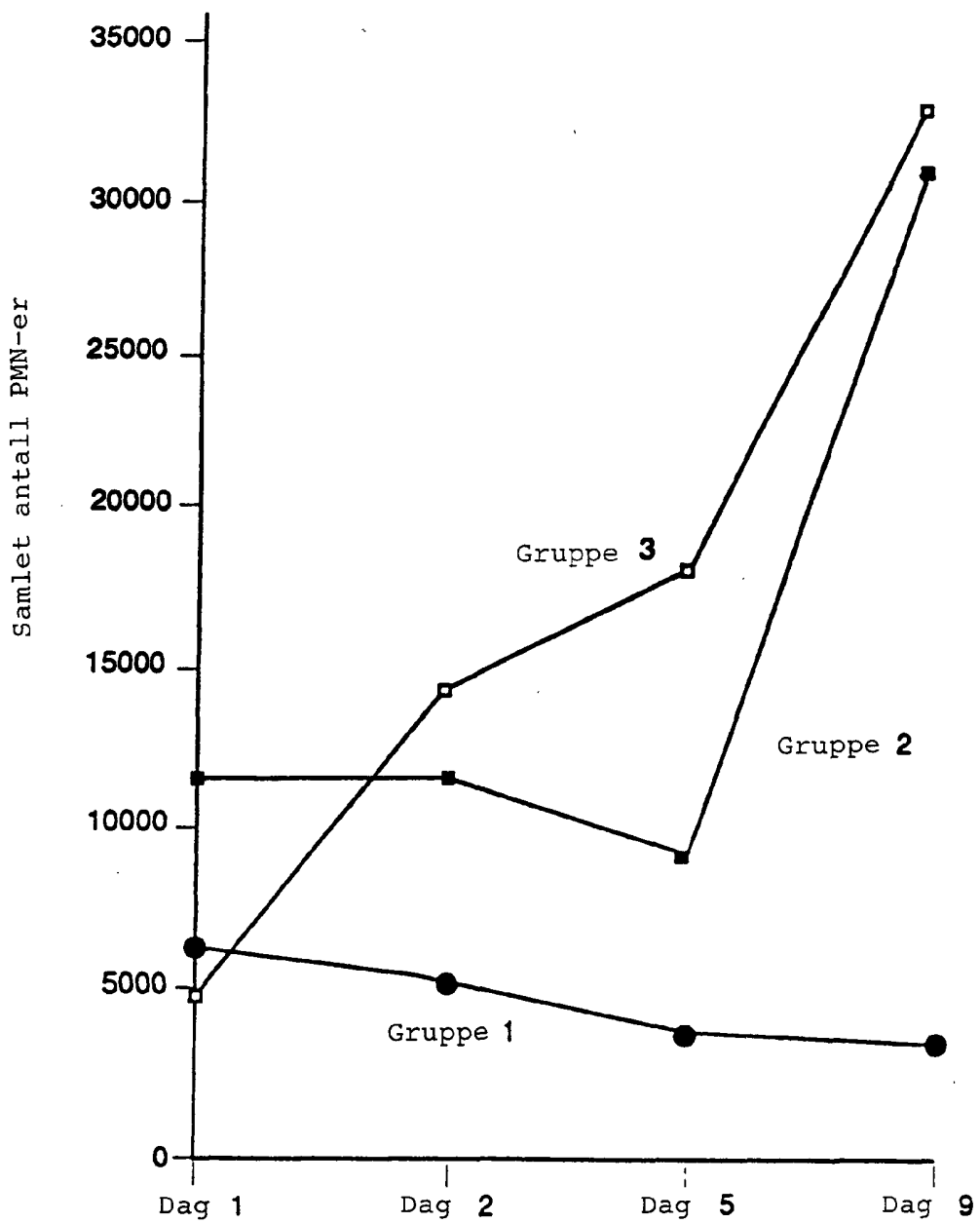


FIG. 17

Samlet antall bånd for dagene 1,2,5  
og 9 etter utfordring

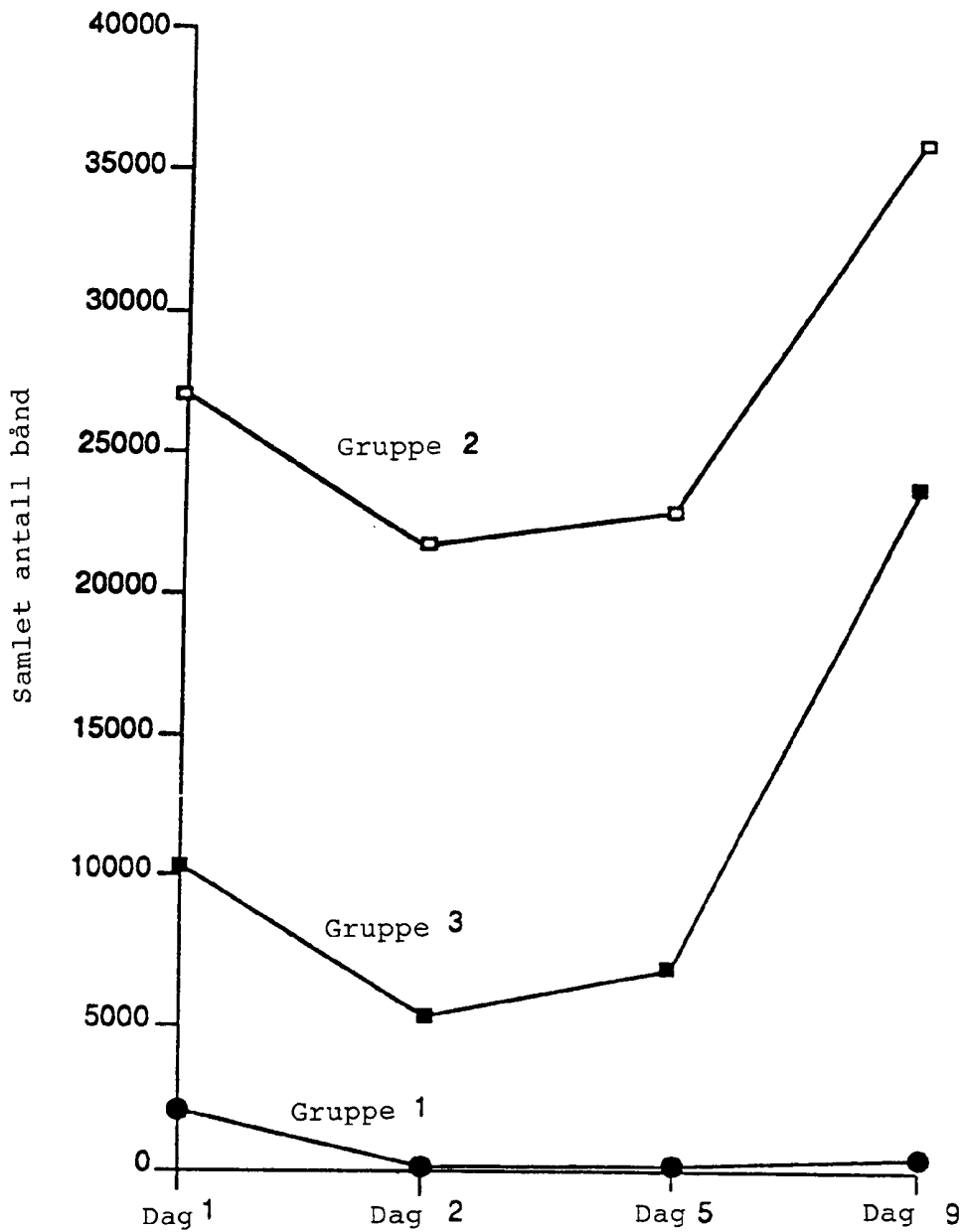


FIG. 18

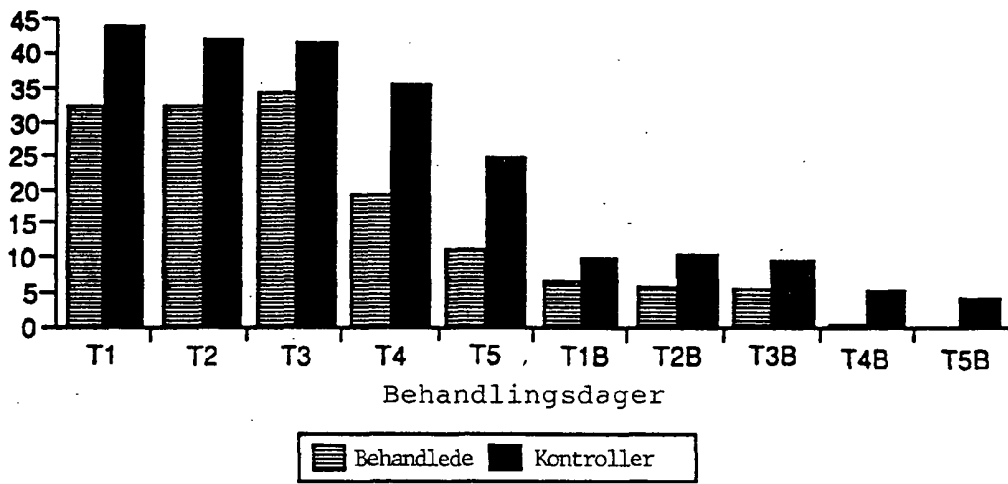


FIG. 19

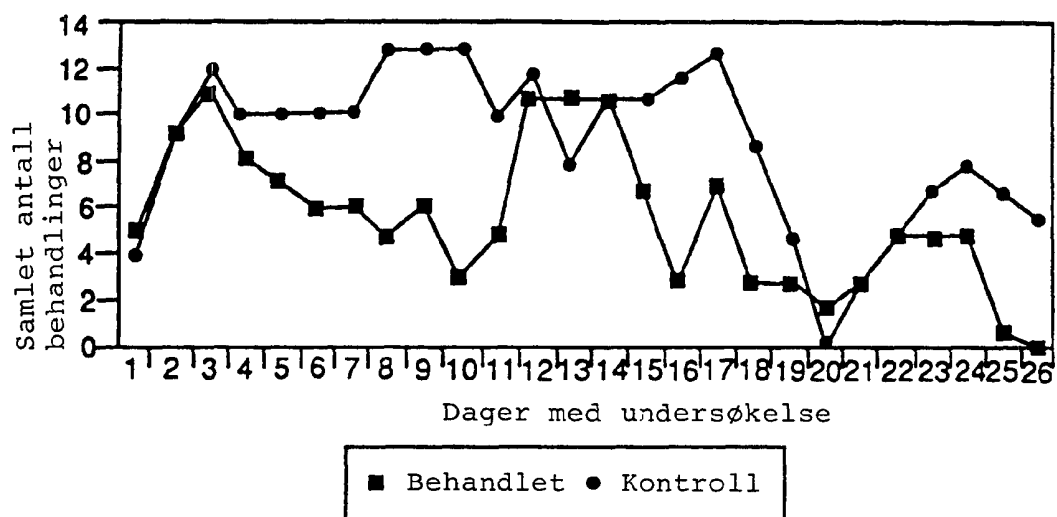


FIG. 20

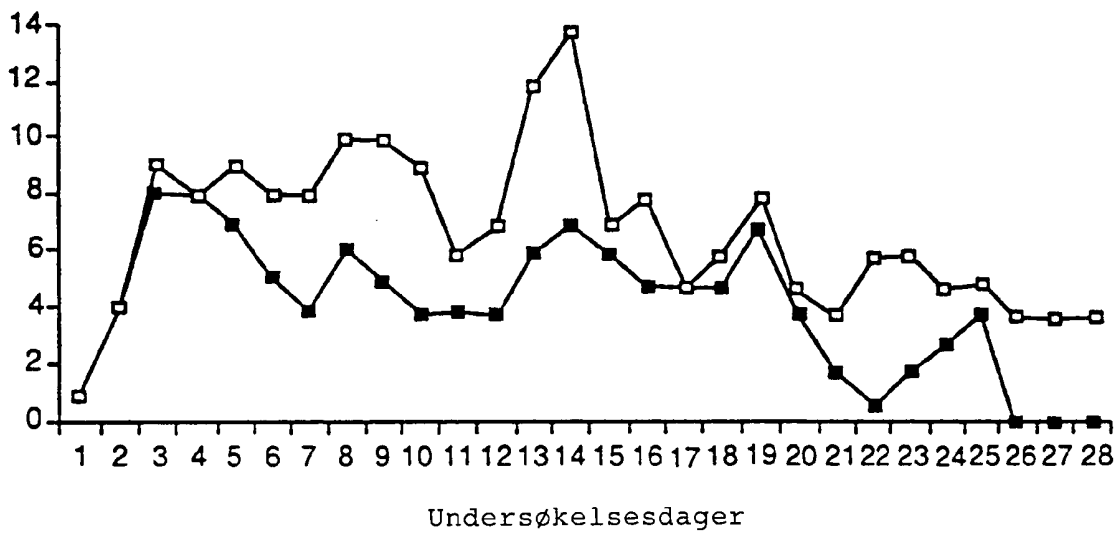
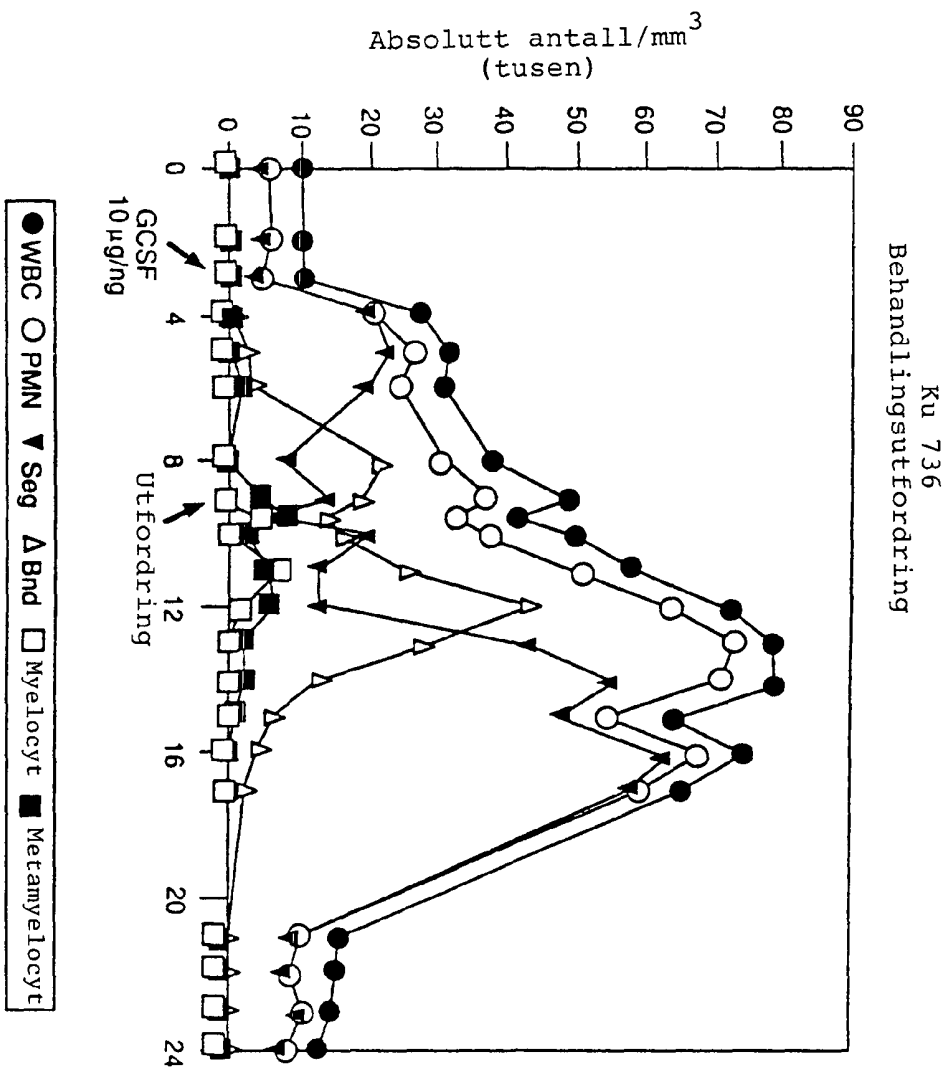


FIG. 21



300217

FIG. 22

Ku 293  
Behandlingskontroll

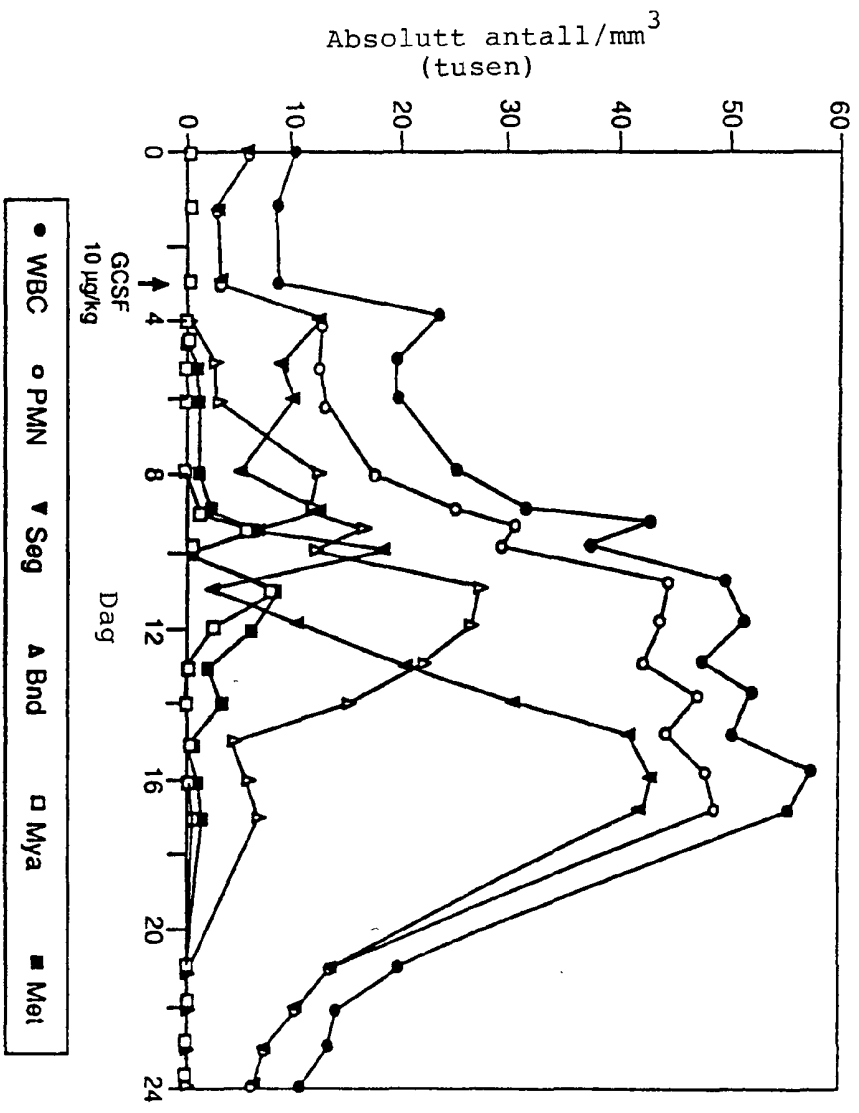


FIG. 23

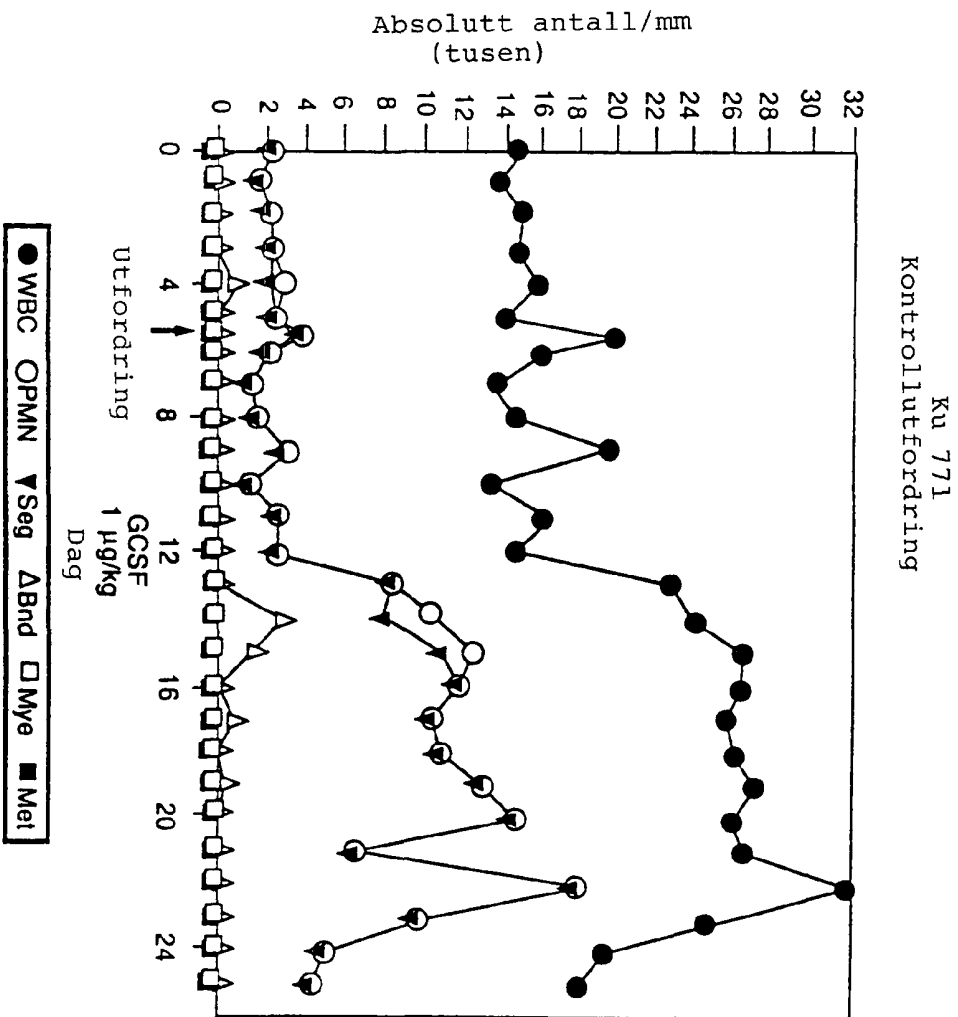


FIG. 24

Melkekulturer, dag 10 - dag 21

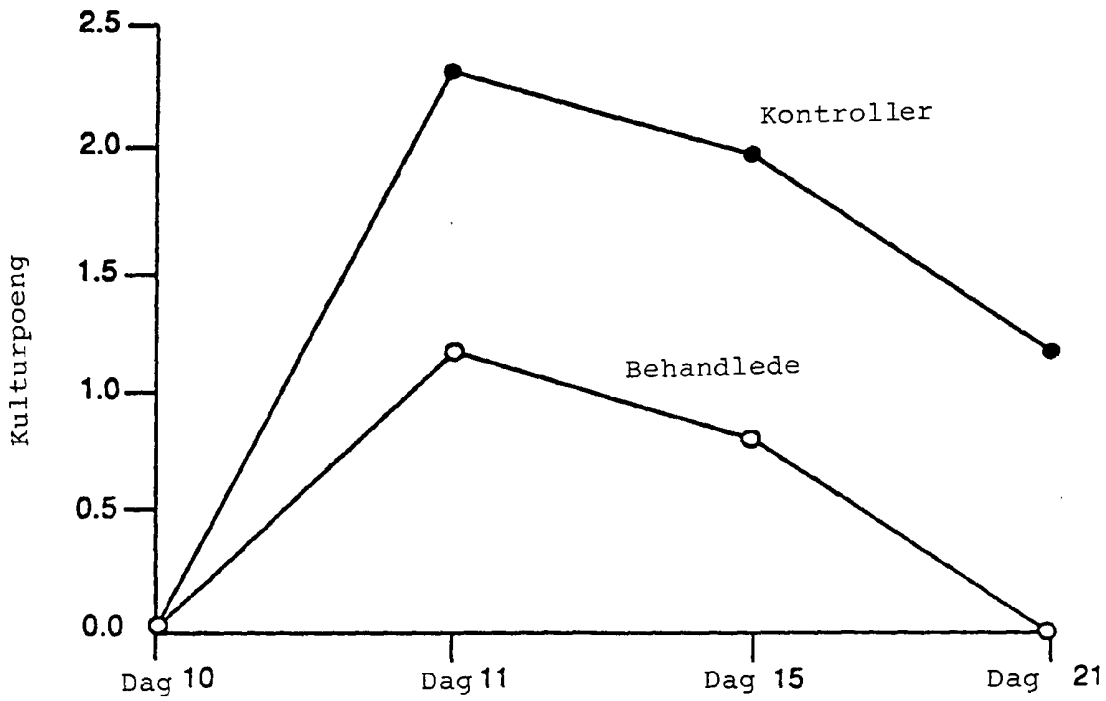


FIG. 25

Kliniske poeng, dag 10 - dag 21

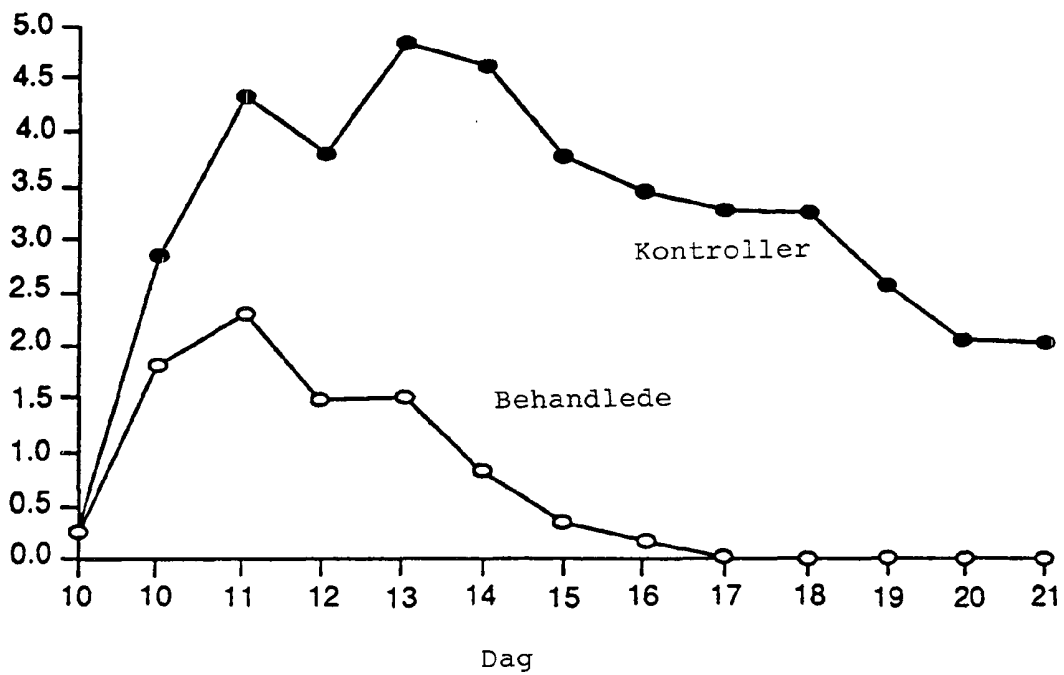


FIG. 26

CMT-poeng, dag 10 - dag 21

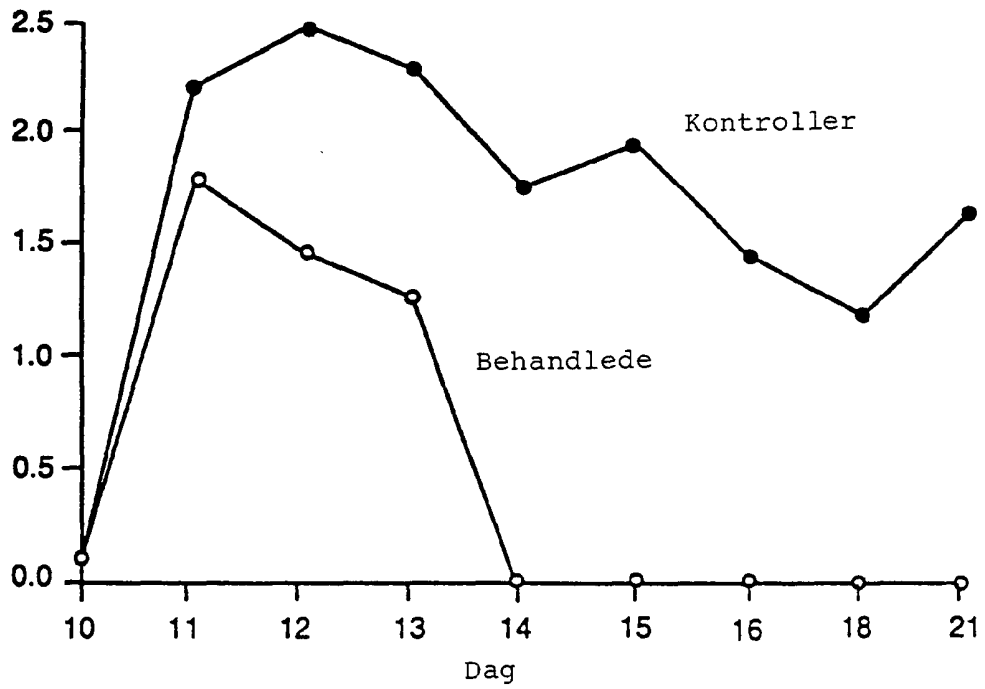


FIG. 27

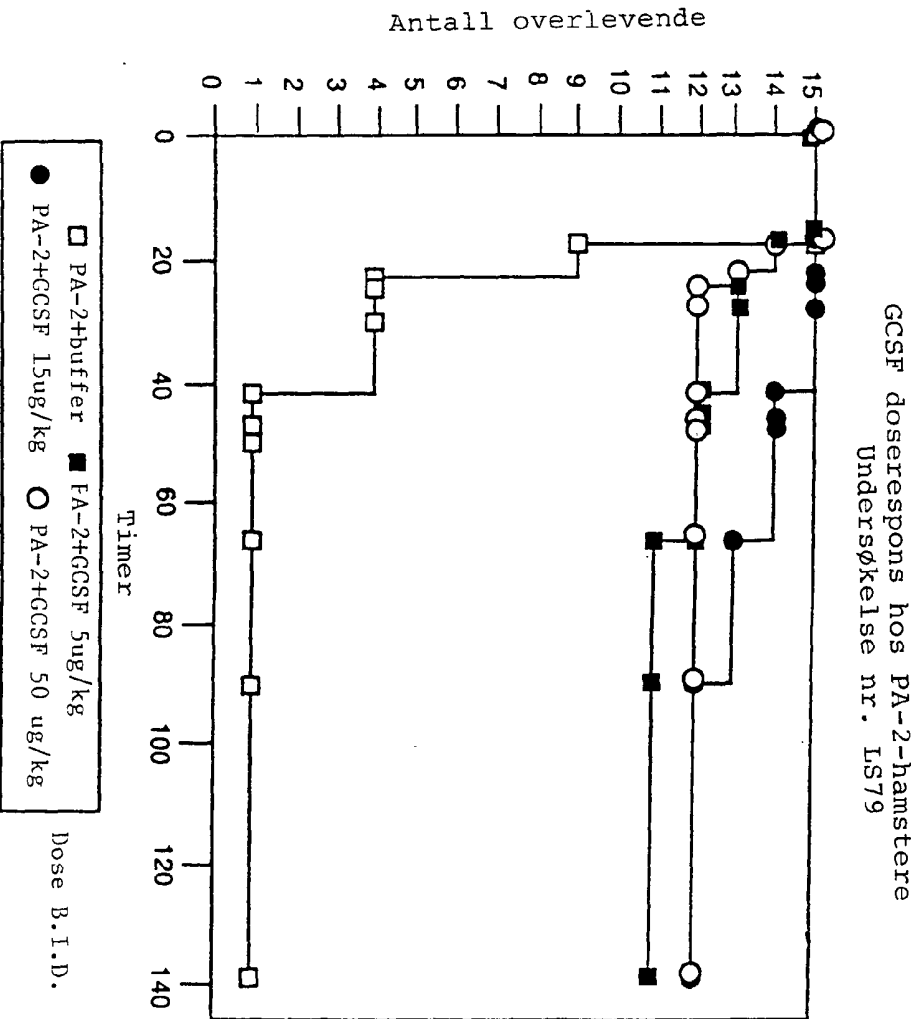


FIG. 28

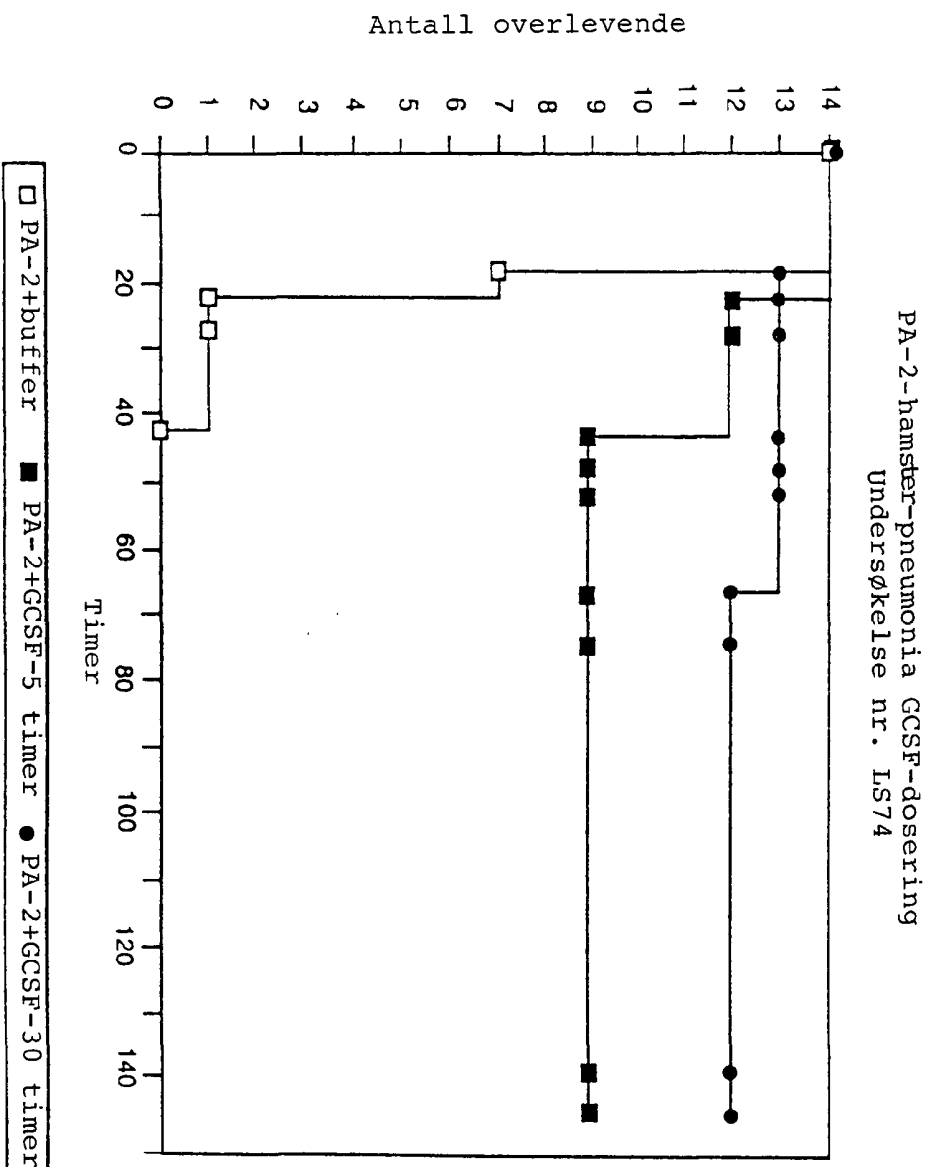


FIG. 29

