

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 905691 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **905691**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/16

C12N 15/85

C12N 5/16

C07K 14/48

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.11.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.11.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **17.05.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

16.11.1989 IT 48564/89

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Fidia S.p.A., Via Ponte Della Fabbrica, 3/A-35031 Abano Terme (prov. Padova), ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Della Valle, Francesco, Padova, ITALIA, (IT)

2 •Callegaro, Lanfranco, Ponte di Brenta, ITALIA, (IT)

3 •Negro, Alessandro, Italy, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä geenivektoreiden valmistamiseksi hermon kasvutekijän ilmentämiseksi eukaryoottisissa soluissa

Förfarande för framställning av genetiska vektorer för expression av nervtillväxtfaktorn i eukaryotiska celler

Menetelmä geneettisten rakenteiden valmistamiseksi hermokasvutekijän ekspressoimiseksi eukaryoottisissa soluissa

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä hermokasvutekijäksi (β -NGF) kutsutun polypeptidin muodostamiseksi transformoituista soluista, etenkin menetelmä ihmisen biologisesti aktiivisen täysin kehittyneen muodon (β -alaysikön) muodostamiseksi yhdistelmä-DNA-teknologialla käyttämällä geneettisiä rakenteita, jotka voidaan siirtää sopiviin eukaryoottisiin solulinjoihin.

A. Hermokasvutekijä (NGF)

Hermokasvutekijä (NGF) on havaittu ensiksi hiiren sarkoomatuumoreissa (tukikudossyöpä) (Levi-Montalcini R. et al., J. Exp. Zool. 116:321, 1951) ja sitten se on puhdistettu ja saatettu homogeeniseksi koiraspuolisten hiirien leuanalussylkirauhasista (Varon S. et al., Biochemistry 6:2202, 1967) ja käärmeenmyrkystä (Angeletti R.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:668, 1970). On esitetty myös useita muita suhteellisen rikkaita NGF-lähteitä, mukaanlukien marsun eturauhanen (Harper G.P. et al., Nature 279:160, 1979) ja ihmisen istukka (Goldstein L.D. et al., Neurochem. Res. 3:175, 1978, Walker, P. et al., Life Science 26:195, 1980, Fidia-patentti 47745A88). Pieniä NGF-määriä on todettu esiintyvän myös muissa kudoksissa, kuten esimerkiksi nisäkkäiden keskushermostossa (Varon S., Discussions in Neuroscience, osa II, n:o 3, 1985; Hefti F. et al., Neuroscience 14:55, 1985). Näiden mahdollisten NGF-lähteiden välinen fysiologinen suhde ja selvät toimintapaikat eivät ole hyvin selviä, mutta yleisesti oletetaan, että NGF erittyy erilaisista perifeerisistä kudoksista, jotka vaativat hermotusta niistä soluista, jotka reagoivat NGF:ään.

Koiraspuolisten hiirien leuanalussylkirauhasista saatua NGF:ää käytetään useimmissa tutkimuksissa tutkittaessa NGF:n aktiivisuutta in vitro ja in vivo. NGF:n biologisen in vitro-aktiivisuuden alue on määritetty sekä primaarisilla her-

mosoluilla että kloonatuilla solulinjoilla. Primaarisia hermosoluja, jotka reagoivat NGF:ään in vitro, ovat sikiön sensoriset neuronit (embryon 8. - 23. päivä) spinaaliganglion (selkäydinhermosolmun) tyvissä, autonomiset noradrenergiset fetaaliset (sikiön) neuronit sympaattisessa gangliossa (sisälmyshermosolmussa), kolinergiset fetaaliset neuronit väliseinässä (septum) ja lisämunuaisen kromaffiinisolut kehitysvaiheessa. Samalla kun sensoriset ja sympaattiset neuronit riippuvat NGF:stä eloonjäämisen ja kehityksen suhteen, kolinergiset neuronit eivät näytä tarvitsevan NGF:ää eloonjäämistä, vaan ainoastaan differentioitumisestaan varten, s.o. fenotyyppisten ominaisuuksien ekspressiota varten, jotka ovat sitoutuneet neurotransmitteriin (hermovälittäjäaineeseen). NGF:n lisäys lisämunuaisen kromaffiinisoluihin (soluihin, jotka ovat peräisin hermostopienasta) niiden kehityksen ensimmäisessä vaiheessa saa aikaan hermo fenotyyppien ekspression. Solulinjoja, jotka reagoivat NGF:ään in vitro, kuten kirjallisuudessa on esitetty, ovat lisämunuaisen kromaffiinisolut, jotka ovat peräisin hermostopienan tuumorista ja jotka tunnetaan feokromosytoomasoluina (PC12), ja ihmisen neuroblastoomasolut. β -NGF-käsittelyn jälkeen nämä solut muuttavat käyttäytymistään ja siirtyvät erittäin lisääntyvästä vaiheesta postmitoottiseen tilaan.

Hiiren leuanalussylykirauhasista saatua NGF:ää on luonnehdittu eniten, myös sen kemiallisen ja immunokemiallisen profiilin suhteen. Hiiren rauhasista peräisin oleva NGF toimii kuten 7S-tyyppinen proteiinikompleksi (molekyyllipaino n. 140.000 daltonia), joka muodostuu kolmesta alayksiköstä (α , β , γ), jotka koordinoivat Zn^{+} -atomin.

7S-molekyylin mielenkiintoisin osa biologisen aktiivisuuden suhteen on muodostettu kahdesta polypeptidiketjusta, joiden kummankin molekyyllipaino on 13.250 ja jotka on muodostettu 118 aminohapolla. Kummassakin ketjussa tai monomeerissä on kolme sulfidisiltaa, jotka muodostavat kovalenttisia sidoksia kahden kysteiinitähteen välille, jotka antavat proteiinin kolmidimensionaaliselle rakenteelle vahvan stabiiliuden.

NGF:n nämä kaksi monomeeriä, jotka ovat liittyneet toisiinsa heikoilla sidoksilla, muodostavat dimeerin, jonka molekyyli-paino on 26.500. On osoitettu, että biologinen aktiivisuus liittyy dimeeriin, jota kutsutaan nimellä 2.5S tai tavan-omaisesti β -yksikkö. Ei ole tunnettua, onko tämä läsnä myös monomeerissä.

Geneettisen manipuloinnin menetelmät ovat mahdollistaneet sen geenin tunnistamisen, joka koodaa NGF:n β -alayksikön (β -NGF) (Scott J. et al., Nature 302:538, 1983; Ulrich A. et al., Nature 303:821, 1983; EP-patenttijulkaisu n:o 0 121 338). Ihmisen geeni, joka koodaa molekyylin, sijaitsee kromosomin I lyhyessä varressa ja koodaa molekyylin synteesiä, joka on paljon suurempi kuin se, jonka molekyyli-paino on 26.500 ja joka muodostaa biologisesti aktiivisen molekyylin. Siten geeni ohjaa aluksi suuremmat dimensiot omaavan NGF-esiasteen tai pro-NGF:n synteesiä. Edelleen on osoitettu, että geeni, joka koodaa NGF:n β -alayksikön, on hyvin säilynyt eri lajeissa, linnuista ihmiseen (Meier, R. et al., EMBO J. 5:1489, 1986).

Hiiren, ihmisen, naudan ja kananpojan β -NGF:n nukleotidisekvenssien selvitys on mahdollistanut näiden molekyylien säilyneiden ja ei-säilyneiden paikkojen ja niiden biologisen aktiivisuuden ja antigeenisyyden suhteen välisen vertailun. β -NGF:n kokonaissäilyvyys kehityksen aikana on yllättävän korkea. Koiraspuolisen hiiren leuanalussylikirauhasista puhdistetun NGF:n kehittyneen muodon 118 aminohaposta ainoastaan 16 aminohappoa ovat erilaisia naudan β -NGF:ssä, 19 kananpojan β -NGF:ssä ja 11 ihmisen β -NGF:ssä, kun taas ihmisen ja naudan β -NGF:n välillä on ainoastaan 6 aminohapon eroavaisuus. Kaikki kysteiinitähteet ovat säilyneet tarkasti kaikissa lajeissa. β -NGF:n kolmen S-S-sillan vähennys saa aikaan sen biologisen aktiivisuuden täydellisen menetyksen. Aminohapposekvenssien kokonaissäilymisen korkean tason ja immunokemiallisen tyyppin alhaisen ristireaktiivisuuden välinen ilmeinen ristiriita johtuu siitä seikasta, että aminohappojen muutokset lajien välillä sijaitsevat erityisissä

"kasaumissa". Hydropaattisilla seurannoilla on mahdollista osoittaa, että nämä muutokset tapahtuvat lähes täydellisesti hydrofiilissä paikoissa, joita pidetään potentiaalisina antigeenideterminantteina (määräävinä tekijöinä). Ainoastaan yhden hydrofiilisen alueen nähtiin olevan tarkasti säilynyt kaikkien tähän asti tutkittujen lajien NGF-molekyyleissä.

B. Yhdistelmä-DNA-teknologia

Yhdistelmä-DNA-teknologia mahdollistaa vektoriryhmien muodostamisen, jotka pystyvät ekspressoimaan kiinnostavia proteiineja suurina määrinä. Tämä teknologia mahdollistaa molekyylibiologisteille DNA-sekvenssin kokoamisen hybridimolekyylien muodostamiseksi, jotka pystyvät tuottamaan kyseessä olevaa proteiinia. Menetelmissä käytetään erilaisia reaktioita, kuten leikkaamista restriktioentsyymeillä, näin saatujen fragmenttien liittämistä ligaasilla, koottavien oligonukleotidien kemiallista synteesiä sekä muita alan eri laboratorioden käytettävissä olevia menetelmiä (Marⁿiatⁿis, T. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Laboratory NY, 1982). Ekspression korkeiden tasojen aikaansaamiseksi koottavien DNA-elementtien on muodostettava olennainen informaatio, esimerkiksi replikaatioalkuperä, antibioottien valinta, ekspressiopromoottori, kyseessä olevan geenin transkription aktivaattorit ja muut ominaisuudet, jotka ovat tunnettuja mainitun aineen viljelijöille. Näiden elementtien yhdistäminen sopivalla tavalla saa aikaan plasmidin, jos kyseessä oleva geeni siirretään luonnollisesti transkription ja translaation säätelysekvenssien suhteen ja muodostunut plasmidi on määriteltä ekspression suhteen. Plasmidi tai ekspressiovektori pystyy siten ekspressoimaan proteiinin isäntäsoluissa. Proteiini voidaan sitten saada puhdistusjärjestelmän avulla. Elementit (promoottorit), jotka valvovat luonnollisesti useiden geenien ekspressiota, kuten esimerkiksi kasvutekijät, eivät ole kovin vahvoja ekspressiossaan ja ne aktivoiduvat ainoastaan luonnollisissa sopivissa olosuhteissa, jotka ovat usein tuntemattomia. Tätä tarkoitusta varten käyte-

tään promoottoreita, joiden aktiivisuus on tunnettu, esimerkiksi papovavirus-ryhmän virusta, tai muita tunnettuja promoivoivia geenisekvenssejä. Elementit, joita käytetään expression korkeita tasoja varten, ovat siten eri lähteistä (eukaryoottisen, bakteeri-, virus- jne.) olevan DNA:n yhdistelmä, joka muodostuu eri geeniosien päässä, jotka on liitetty yhteen hybridin muodostamiseksi. Geenin transkriptio- ja translaatioaktiivisuus riippuu säätely- ja koodaussekvenssien välisistä sopivista väleistä.

Tämän johdannon mukaisesti eräs parhaimmista tavoista käsitellä sopivasti säätelysekvenssejä on sellainen, jossa liitetty geeni sijoitetaan samaan asemaan kuin luonnollisessa geenissä. Eräs järjestelmä, jota käytetään, on sellainen, jossa säätelysekvenssit käsittävät myös muutamia koodaussekvenssien aminohappoja. Yhtyminen liitetyn geenin kanssa saa sitten aikaan fuusioidun proteiinin. Jos toisaalta fuusioitu osa poistetaan, on mahdollista saada aikaan parempia biologisia arvoja. Jos ei käytetä fuusioproteiinien tekniikkaa, tavanomaiset tekniikat geenien aikaansaamiseksi, jotka sijaitsevat säätelysekvenssien läheisessä läheisyydessä, riippuvat sopivien restriktiopaikkojen olemassaolosta, jotka mahdollistavat niiden kloonauksen. Jos yhteensopivia paikkoja ei ole lähialueilla, vaan eri paikoissa, on mahdollista saada aikaan segmenttien yhtyminen oligonukleotidin tai yhdistäjän (linker) synteetillä, joka sisältää halutun restriktiopaikan. Jos läheisyydessä ei ole olemassa yhdistäjän käytön mahdollistavia restriktiopaikkoja, silloin käytetään DNA:n deleetiotekniikkaa Bal 31:llä tai S1:llä. Tämä mahdollisuus ei mahdollista tarkkaa deleetiota ja on aina tarpeen tarkastaa sekvensoimalla eri kloonit, jotta nähdään, mikä on sopivin. Nämä järjestelmät ovat hyvin rajoittavia molekyylibiologian kannalta ja siten on tarpeen kehittää vaihtoehtoisia strategioita uusien tekniikojen esiintymisen mukaisesti, kuten polymeraasiketjureaktion (PCR) tekniikka (Saiki et al., Science 239:487, 1988; Scharf, S. J., Science 233:1076, 1986).

Tällä tekniikalla on mahdollista laajentaa geenisegmenttiä aina arvoon 10^6 . Periaate perustuu kahden oligonukleotidin käyttöön, jotka voidaan yhdistää pareittain, kulloinkin yksi toiseen laajennettavista DNA-säkeistä. Väli, joka tulee kahden oligonukleotidin väliin tutkittavan geenisekvenssin suhteen, määrää valmistettavan molekyylin dimensiot. Nämä kaksi oligonukleotidiä on muodostettu siten, että niiden sekvenssin sisäpuolella on restriktiopaikka, joka mahdollistaa niiden myöhemmän kloonauksen. Tämä restriktiopaikka on läsnä luonnollisesti tai se muodostetaan ad hoc degeneroimalla emästen vähimmäismäärä. Tämä lähestymistie, joka voidaan määrittää paikka-kohdistettuna mutageneesinä, mahdollistaa restriktiopaikkojen muodostamisen aseisiin, jotka molekyylibiologisti määrittää teoreettisesti. Paikkojen muodostaminen, jotka sopivat yhteen muiden geenisegmenttien kanssa, mahdollistaa toisaalta helpon kloonauksen, mutta saa aikaan etenkin eri geenisegmenttien yhdistämismahdollisuuden aiotulla tavalla. Tämä tekniikka voidaan määrittää kloonaukseksi suoran mutageneesin avulla. Käytännössä yhdistelmä-DNA-tekniikalla on mahdollista expressoida täydellisiä heterologisia polypeptidejä suoran expression avulla tai vaihtoehtoisesti voidaan ekspressoida heterologinen polypeptidi, joka on fuusioitu samanlaisen polypeptidin aminohapposekvenssiosan kanssa. Yleensä tällä tavalla saadut tuotteet eivät ole biologisesti aktiivisia (brittiläinen hakemusjulkaisu n:o 2007676A; Wenzel, American Scientist 68, 664, 1980).

Kyky eristää hermokasvutekijän β -alaysikön ihmisen geeni tarjoaa tärkeän mahdollisuuden. On mahdollista tuottaa yhdistelmä-DNA-tekniikalla riittävä määrä tätä harvinaista proteiinia. Itse asiassa hermokasvuproteiini voidaan hyväksyä kliiniseen käyttöön erilaisten neurodegeneratiivisten sairauksien hoidossa. Tässä mielessä on olemassa dokumentteja koskien NGF:n β -alaysikön muodostamista yhdistelmä-DNA-tekniikalla (eurooppalainen patenttijulkaisu n:o 0121388; Bruce, G. et al., Neurobiology of Aging 10:89, 1989; Hu, G. et al., Nucleic Acid Research 70:57, 1988; Edwards, R. H.,

Mol. Cell. Biol. 8:2456, 1988; Emfors, P., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:4756, 1989). Valmistusta varten valitaan mieluummin nisäkkäiden soluja kuin ainoastaan bakteereita niissä tapauksissa, joissa ei voida toteuttaa halvempaa expressiota mikrobisoluiissa. Itse asiassa on paljon taloudellisempaa valmistaa määrättyjä proteiineja bakteerilinjoiissa, kuten E. coliissa, mutta yleensä tämä isäntä/vektori-järjestelmä jäljentää uskollisesti ainoastaan proteiinin muodostavien aminohappojen lineaarisen sekvenssin, jolloin bakteerissa saadaan eräänlainen liukenematon massa. Olettaen, että määrätty tuote voidaan valmistaa tästä materiaalista taloudellisesti edullisella tavalla, E. coli voisi olla valittu järjestelmä, kuten määrättyjen pienempien molekyylien, kuten interferonien ja joidenkin eläinkasvuproteiinin kohdalla, joissa voidaan toteuttaa molekyylin oikea kääntö in vitro. Nämä järjestelmät ovat erittäin tuottavia tapauksissa, jotka yleensä koskevat niitä proteiineja, joissa on yksittäinen disulfididisidos ja peptidejä, tai proteiinia, jonka käyttö (diagnostisina antigeeneinä tai rokotekomponentteina) ei vaadi hyvin määritettyä konformaatiota.

Terapeuttiset proteiinit, joihin hermokasvutekijä (β -NGF) kuuluu, vaativat oikeaa konformaatiota ollakseen aktiivisia ja käyttökelpoisia ja niiden on oltava myös vapaita antigeenisestä reaktiosta. Valmistusmenetelmät voisivat käsittää yhdistelmä-DNA:sta saadun proteiinin kohdalla glykosyloinnin, oikeiden disulfididisidosten muodostamisen ja muita post-transduktio-modifikaatioita. Bakteerilinja E. coli ei pysty täyttämään tätä vaatimusta, kun taas nisäkkään eukaryootiset solut ja hiivat pystyvät. Ihmisen β -NGF:n mahdollisen käytön bioteknologialla aikaansaatusena farmaseuttisena aineena tulisi ottaa huomioon nämä ongelmat.

NGF:n aktiivisuuden on osoitettu riippuvan dimeerisestä muodosta, s.o. 118 aminohapon kahden samanlaisen polypeptidin ryhmästä. Pelkistys merkaptotoetanolilla alentaa biologisen aktiivisuuden käytännöllisesti katsoen nollassi. Yritykset renaturoida kolme disulfididisiltaa saavat aikaan kysteiinin

uudelleenyhdistymisen, statistisesti katsottuna, molekyyliksi, jolla on oikea rakenne ja joka on samanlainen kuin se, joka vastaa luonnollista molekyyliä, mahdollisuuden ollessa yhdestä viiteentoista. Siten molekyylin aikaansaaminen E. colissa ei takaa rakenteen homologiaa ja sen sovellutusta farmaseuttisena aineena ihmisessä. Itse asiassa sen jälkeen, kun E. colista tuotettu ihmisen NGF on puhdistettu homogeeniseksi, se osoittaa immunoblot-menetelmässä hiiren β -NGF:lle spesifisillä polyklonaalisilla vasta-aineilla kaistan ryhmän, joiden ei voida katsoa johtuvan biologisesti aktiivisesta dimeerisestä muodosta. Edelleen tämän rakenteiden ja muotojen seoksen biologisen aktiivisuuden on osoitettu olevan 10 kertaa vähäisemmän verrattuna samanlaiseen ihmisperäiseen muotoon, joka on puhdistettu luonnollisista lähteistä, kuten plasentakudoksesta (istukkakudoksesta).

Tämä lähestysmistie, jossa hermokasvutekijä kloonataan ja aikaansaadaan E. colissa, vaikkakin se toisaalta tuottaa kyseessä olevan proteiinin korkeita ekspressiotasoja, tuottaa sarjan epätarkkoja molekyyliä, jotka annettaessa in vivo voisivat aiheuttaa sekundaarisia vaikutuksia, esimerkiksi vasta-aineita, jotka tunnistaisivat ja salpaisivat luonnollisesti läsnä olevan molekyylin biologisen aktiivisuuden. Samanaikaisesti täysin kehittyneen molekyylin kloonaus E. colissa tuo esiin aloitusmetioniinin, jota on mahdoton poistaa ja joka on varmasti immunogeeninen, koska se on sijoitettu molekyylin avoimeen osaan.

Eräs toinen lähestysmistie koskee prepro-NGF:n kloonausta eukaryoottisissa soluissa ja siinä käytetään hyväksi eukaryoottisissa soluissa luonnollisesti läsnä olevien spesifisten peptidaasien vaikutusta täysin kehittyneen molekyylin aikaansaamiseksi. Etenkin kloonaus suoritetaan Chinese-hamsterin munasarjojen (CHO) soluissa. Nykyisessä kirjallisuudessa ihmisen NGF:n koko genomista kloonausta ei ole vielä sekvenssoitu, mutta on osoitettu, että geeni laajenee yli 10 kda:n osalle (Ullrich, A. et al., Nature 303:821, 1983). Näin laajennettu geeni ei mahdollista tavanomaista kloonau-

ta, joka lähtee koko tästä genomisesta sekvenssistä. Lähestymistienä on, että kloonataan cDNA:n osa, joka sisältää ai-noastaan proteiinin koodausosat. Tällä hetkellä ihmisen NGF:n täydellistä cDNA:ta ei ole vielä eristetty (muutamia sekvenssejä puuttuu 5'-asemassa), mutta tunnetaan paljon in-formaatiota NGF:n läheteistä, jotka ovat peräisin muista lähteistä (hiiri, nauta, kana, jne.) (Meier, R. et al., EMBO J. 5:1489, 1986; Selby, H. J., J. of Neuron Research 18:293, 1987) ja jotka voivat johtaa mielenkiintoisiin johtopäätöksiin. Hiiren NGF-geeni on läsnä yksinkertaisena kopiona ja se tuottaa vähintään neljä erilaista, erilaiset dimensiot omaavaa lähettiä (Selby, M. J. et al., Mol. Cell. Biol. 7:3057, 1987). Nämä erilaiset dimensiot heijastuvat etenkin erilaisessa lähtö-AUG-kodonissa, tärkeimmät ovat asemassa -187 ja -121 täysin kehittyneen proteiinin suhteen. Nämä lähetit ovat läsnä erilaisessa runsaussuhteissa erilaisten kudosten suhteen. Sellaiset, jotka alkavat asemassa -187, ovat 10 kertaa runsaampia leuanalussylikirauhasessa verrattuna sellaisiin, jotka alkavat asemassa -121. Kuitenkin eri to-disteet ovat osoittaneet, että aivoissa ekspressoitujen NGF-lähetien yhdenmukaisin prosenttimäärä käyttää täsmälleen AUG:ta, joka on asemassa -121.

Tämä keksintö koskee siten menetelmää ihmisen NGF:n β -alayksikön aikaansaamiseksi ekspressiovektoreilla, niin että luonnollinen väli esiintyy säätelypaikkojen ja mainittua proteiinia koodaavien paikkojen välillä, vektoreilla, joita käytetään eukaryoottisissa solulinjoissa, esimerkiksi CHO:ssa ja jotka mahdollistavat ihmisen hermokasvutekijän β -alayksikön (h β -NGF) täysin kehittyneen muodon aikaansaami-sen viljelyalustalla yhden tai useamman aminohapon puuttues-sa, jotka on fuusioitu polypeptidiin ja jotka poikkeavat niistä, joita on läsnä sen luonnollisessa sekvenssissä. Näin saadulla polypeptidillä on biologinen aktiivisuus sopivissa kohdesoluissa käytettynä.

Tässä keksinnössä selitettyä h β -NGF:ää voidaan käyttää her-motoiminnan ylläpitämiseksi tai sen menetyksen estämiseksi,

sen regeneroimiseksi kroonisissa tai akuuteissa patologisissa tiloissa, neurodegeneratiivisissä tilanteissa jopa akuuttien patologioiden tardiiivisissa vaiheissa, kuten serebrovaskulaarisissa (aivo-verisuoni), infektiivisissä, inflammatorisissa, kompressiivisissä, metabolisissa puutteellisuuksissa ja immuunijärjestelmän modulaatiotilanteissa. Saadusta polypeptidistä puuttuu edelleen ihmisperäiset muut epäpuhtaat proteiinit, joilla voisi olla ei-toivottu biologinen aktiivisuus.

Keksintö koskee edelleen geneettisiä rakenteita, joita voidaan käyttää solutransfektioita varten, mukaanlukien sellaiset, jotka voidaan implantoida (istuttaa) in vivo. Muutamat näistä rakenteista voivat tuottaa paikallisella tasolla spesifisesti ihmisen kasvutekijän aktiivisen muodon annetun ruokavalion funktiona, s.o. geeni on mahdollista pitää valvonnassa.

Keksintö koskee edelleen transformoitua solukantaa, joka sisältää mainittuja vektoreita, ja sen viljelmää, joka tuottaa h β -NGF:ää. Tämän keksinnön kohteena ovat edelleen farmaseuttiset valmisteet, jotka sisältävät aktiivisina aineina yhtä tai useampaa neurotrofisen tekijän β -yksikön ja luonnollisen gangliosidin tai sen johdannaisen tai semisynteettisen analogin tai suolan uutta kompleksia.

Piirustuksissa

kuvio 1 on ihmisen hermokasvutekijän β -alayksikön polypeptidin hydropatisiteettiprofiili,

kuvio 2 esittää kaaviomaisesti pMSGphNGF-ekspressiovektorin rakennetta,

kuvio 3 esittää kaaviomaisesti pMSGphNGF-ekspressiovektoria,

kuvio 4 esittää kaaviomaisesti pSV40MTphNGF-ekspressiovektorin rakennetta,

kuvio 5 esittää kaaviomaisesti pSV40MTphNGF-ekspressiovektoria,

kuvio 6 esittää kaaviomaisesti pSV40phNGF-ekspressiovektorin rakennetta,

kuvio 7 esittää kaaviomaisesti pSV40phNGF-ekspressiovektoria, ja

kuvio 8 esittää kaaviomaisesti pSV40hNGF-ekspressiovektorin rakennetta.

Lähtemällä näistä todisteista tämän keksinnön mukainen ihmisen β -NGF kloonattiin lähtemällä tarkasti -121-asemassa olevasta metioniinistä. Hydropatisiteettiprofiilin analyysit ovat osoittaneet, että asemien -121 ja -104 väliset aminohapot voivat toimia alkupeptidinä, mikä osoittaa, että proteiini voidaan erittää. Kuviossa 1 on esitetty tämä profiili, ihmisperäisen hermokasvutekijän alayksikön polypeptidin hydropatisiteettiprofiili, menetelmän mukaisesti, jonka ovat esittäneet Hopp et al. julkaisussa Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824, 1981. Asema, joka on merkitty -121/-104:nä, esittää alkupeptidiä, kun taas asema, joka on merkitty +1/+118:na, esittää ihmisperäisen hermokasvutekijän β -alayksikön polypeptidin aminohapposekvenssiä (Ullrich et al., Nature 303:821, 1983). Täysin kehittyneen proteiinin tuottamiseksi on olemassa spesifinen peptidaasi, joka mahdollistaa aminohapposekvenssin tuottamisen asemasta +1 ja asemassa +118, joka vastaa biologisesti aktiivista peptidiä. Tämän peptidaasin, joka sisältyy soluihin, jotka normaalisti syntetisoivat NGF:ää, osoitettiin sisältyvän myös AT-20-soluihin. Itse asiassa liittämällä näihin soluihin vektori, joka koostuu hiirestä peräisin olevasta vacciniavirus-prepro-NGF:stä, ne pystyvät erittämään täysin kehittynyttä NGF:ää mahdollistaen 14 kda:n molekyylin valmistamisen geelissä denaturointi- ja pelkistysolosuhteissa (Edwards, R. H., Mol. Cell. Biol. 8:2456, 1988).

Aikaisempien kokemusten mukaisesti valmistettaessa yllä esitettyä hermokasvutekijän β -alayksikköä tämän keksinnön keksijät vertasivat innovatiivisesti yhden tai useamman vekto-

rin rakennetta, joita voidaan käyttää eukaryoottisissa soluissa. Prepro-NGF:n kloonauksen suorittamiseksi käytettiin PCR-tekniikkaa, jolla saatiin aikaan paikat, jotka olivat yhteensopivia erilaisten ekspressiovektoreiden kanssa, ja nämä restriktiopaikat sijoitettiin siten, että säilytettiin mahdollisimman luonnollisina säätelysekvenssien ja koodaussekvenssien väliset välit, tilanne, joka on melko poikkeava aikaisemmin kirjallisuudessa esitetyistä geneettisistä rakenteista β -NGF-alayksikön ekspressoimiseksi. Prepro-NGF:n osa liitettiin ihmisen täysin kehittyneeseen modifioituun NGF- ($h\beta$ -NGF) sekvenssiin (valmistaja British Technology Ltd., Oxford, Iso-Britannia), johon muodostetaan restriktiopaikat myöhemmän mutageneesin mahdollistamiseksi. Keksinnön tarkoitusta varten näiden restriktiopaikkojen läsnäoloa ei ole pidettävä rajoittavana, koska geenin alkuperääkään ei ole pidettävä rajoittavana.

Lähdettäessä tästä olettamuksesta tämän keksinnön keksijät kloonasivat sitten prepro- $h\beta$ -NGF:n erilaisten promoottoreiden SV40 (Simian-virus 40), MTTV (hiiren nisätuumorivirus), hMTIIa (ihmisen metallotioneiini IIa) valvonnassa. Nämä geneettiset sekvenssit, jotka liitettiin plasmideihin, siirrettiin sitten CHO-soluihin, mikä osoitti, että jopa nämä solut pystyvät tuottamaan viljelyalustassa h-NGF-polypeptidiä sen biologisesti aktiivisessa muodossa. Tämä prepro-NGF on osoittautunut olennaiseksi molekyylin kokoonpanossa mahdollistaen ainoastaan β -alayksikön ekspression ja osoittaen, että koko geneettistä rakennetta oli pidettävä oikeana.

A. Käytetyt yleiset menetelmät

DNA-ketjujen käsittelyt restriktioentsyymeillä suoritetaan valmistajayhtiöiden ohjeiden mukaisesti. Yleensä 1 μ g plasmidia leikataan 1 U:lla entsyymiä 20 μ l:ssa liuosta. Lämpötila ja inkubaatioaika riippuvat käytetystä entsyymistä, yleensä 1 tunti 37°C:ssa. Inkubaation jälkeen plasmidi ja geneettiset segmentit puhdistetaan agarosigeelissä LMP Aga-

rose (BRL, USA) 40 mM:ssa tris/HCl:ää, 20 mM:ssa natriumasettaattia, 1 mM:ssa EDTA:ta ja sitten eluoidaan agarosista GENECLAN™-varusteilla (BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA). Kopiontireaktioita varten 5'-päässä DNA:ta käsitellään 15 minuutin ajan 15°C:ssa 10 U:lla polymeraasia (Klenow). Ligaaseja varten ligaasia T4 käytetään 1 U:n konsentraatiossa/0,5 µg DNA:ta 20 µg:n reaktiossa 13°C:ssa 12 tunnin ajan.

Analyysit plasmidin oikeiden sekvenssien vahvistamiseksi suoritetaan transformoimalla HB101-soluihin ja valitut transformantit kasvatetaan agarosi-levyillä LB- (Luria Bertani) alustassa, joka sisältää ampicilliini-antibioottia (50 µg/ml). HB101-soluihin sisältyvä plasmidi kasvatetaan LB:ssä, joka sisältää 100 µg/ml ampicilliiniä, ja puhdistetaan, joko pieniä tai suuria valmistuksia varten, Quiagen-varusteilla (DIAGEN GmbH, Düsseldorf, Saksan Liittotasavalta). Ekspressiovektorit valmistetaan bakteerisolusta Quiagen-menetelmällä.

PCR-reaktioiden DNA valmistetaan seuraavalla tavalla ihmisen plasentasta (istukasta) määrääjassa. 0,4 cm³:n pala suonikalvon lisäkkeistä leikataan saksilla ja suspendoidaan 700 µl:aan, joka sisältää 50 mM tris/HCl:ää, pH 7,8, 100 mM EDTA:ta, 100 mM NaCl:ää, 1 % SDS:ää. Tähän lisätään sitten 35 µl proteinaasia (K 100 µg/ml) ja inkuboidaan yön yli 55°C:ssa. Sitten 20 µl liuosta lisätään 13 µg:aan/ml RNAaasia A ja inkuboidaan edelleen 2 tunnin ajan. Uutetaan kaksi kertaa fenolilla ja kaksi kertaa kloroformilla. DNA saateetaan sitten saostumaan lasikapillaarilla lisäämällä 1 tilavuusosaa isopropanolia. Tässä kohdassa suoritetaan muutamia läpikulkua 70%:isella ja 100%:isella etanolilla ja kuivataan. DNA liuotetaan puskuriin (10 mM tris/HCl:ää, pH 7,4, 1 mM EDTA:ta) ja sekoitetaan hitaasti testiputkessa. Muutaman tunnin jälkeen liuennut DNA on valmis geneettiseen laajennukseen. Normaalisti 0,1 µg DNA:ta riittää PCR:n suorittamiseksi.

Transfektio (siirto) CHO-soluihin (CCL 61) ja CHO:hon, joka on modifioitu dehydrofoloidun reduktaasigeenin (DHFR-) pois-

saollessa, suoritetaan liposomeilla noudattamalla GIBCO-yhtiön ohjeita tai kalsiumfosfaatilla.

A.2 Liposomien transfektio

5 % naudan fetaalista seerumia sisältävässä alfa-MEM:issä kasvaneet solut trypsinoidaan päivää ennen transfektiota ja päällystetään uudelleen, niin että ne pystyvät seuraavana päivänä saavuttamaan 70 - 80 %:n konfluenssin (yhtymisen). Transfektoitava plasmidi-DNA laimennetaan DNA:n 10 µg:n konsentraatioon 50 µl:ssa H₂O:ta, johon lisätään sitten 50 µl Lipofectin[™]:iä (GIBCO), jolloin tämä kaikki suoritetaan polystyreeniputkessa. Annetaan seistä 15 minuutin ajan, sitten tämä seos lisätään soluihin, joka on edellä pesty OPTI-MEM:illä (GIBCO). Soluja inkuboidaan tällä tavalla 8 tunnin ajan ja sitten lisätään kasvun jatkamiseksi normaalia alustaa, joka sisältää fetaalista naudan seerumia.

A.3 Transfektio menetelmä kalsiumfosfaatilla stabiilin transformaation aikaansaamiseksi

Tässä menetelmässä transfektioon käytetyt puskurit ovat seuraavat: kahdesti konsentroitua BBS (2 x BBS) ja 0,25-molaarinen CaCl₂. 2 x BBS valmistetaan seuraavasti: 50 mM N,N-bis-2-(hydroksietyyli)-2-aminoetaanisulfonihappoa (Calbiochem), 280 mM NaCl:ää ja 1,5 mM Na₂HPO₄:ää liuotetaan veteen ja pH säädetään arvoon 6,5 ja sitten tämä kaikki suodatetaan 0,45 µm:ssä, kun taas 10 x CaCl₂ valmistetaan 2,5-molaarisena CaCl₂:n liuoksena.

Solut levitetään 5 x 10⁵ solua/10 cm levyä/10 ml kasvualustaa ja niitä inkuboidaan 35°C:ssa yön yli. 20 µg:aan plasmidia sekoitetaan 0,5 µl 0,25-molaarista CaCl₂:ta ja 0,5 ml 2 x BBS:ää. Seosta inkuboidaan 15 minuutin ajan ympäristön lämpötilassa. Seos lisätään sitten tipoitain alustaan ja sitten tätä inkuboidaan yön yli 35°C:ssa 3%:isessa CO₂:ssa. Stabiilisti transformoitujen solujen aikaansaamiseksi, jotka sisältävät vektoreitamme, suoritetaan kotransfektio lisäämällä vektorin ekspressoivaan hβ-NGF:ään pSC2Neo-vektoria

suhteessa 10:1. 2 päivää transfektion jälkeen solut trypsiinoidaan ja levitetään levyille konsentraatiossa, joka on 10 kertaa vähemmän transfektioon verrattuna, ja välittömästi tämän jälkeen aloitetaan stabiilien transformaatioiden valinta 1 mg/ml G418-neomysiinisulfaattia (Gibco). Transformantit analysoidaan sitten Southern blotting-menetelmässä geneettisen rakenteen integroimiseksi.

A.4 Ekspressio

Kaikki solujen alustat pidetään ekspressiota varten Ham's F12/DME H-21:ssä, joka sisältää 15 mM Hepestä ja 10 % fetalista vasikanseerumia. Alusta vaihdetaan joka 3. päivä ja korvataan tuoreella alustalla ilman seerumia h β -NGF:n puhdistamiseksi.

B. Edullisia suoritusmuotoja

B.1 Ekspressiovektoreiden rakenteen selitys

Valmistetaan 3 erilaista vektoria. Ensimmäinen ja toinen ovat vektoreita, joissa voidaan indusoida kemiallisesti säätelyelementit, MMTV (hiiren nisätuumori-virus) ja vastaavasti hMTIIA (ihmisen metallotioneiini IIa). Tällä tavalla on mahdollista ekspressoida kontrolloidusti h β -NGF-geeni. Sitä vastoin kolmannessa vektorissa kloonataan h β -NGF promoottorin SV40 (Simian-virus 40) vaikutuksessa.

B.2 Kloonaus pMSG-ekspressiovektorissa

pMSG-vektorin toimitti Pharmacia (Uppsala, Ruotsi). Valmistajan ohjeiden mukaisesti liitettävä geeni on siirrettävä moninkertaisiin kloonauspaikkoihin Nhe I- ja Sal I-restriktiopaikkojen väliin. Geeni siirretään sen ensimmäisellä AUG:llä. Tässä tapauksessa hermokasvutekijä on MMTVLTR:n (Mouse Mammary Tumor Virus Longy Terminal Repeat) promoottorin valvonnassa. Tämän promoottorin aktiivisuus voidaan indusoida antamalla glukokortikoideja, esimerkiksi deksametasonia. Transskriptiossa silmukointi tapahtuu pienellä SV40:n

t-antigeenillä ja polyadenyloidaan suurella SV40:n t-antigeenillä. Tämä plasmidi sisältää myös ksantiiniguaniinifosforibosyyli transferaasin (xgpt) bakteerigeenin, jota käytetään stabiilisti transformoituneiden CHO KI-solujen valitsemiseksi.

Prepro-NGF:n kloonauksen mahdollistamiseksi tähän plasmidiin käytetään PCR-tekniikkaa, jolla saadaan aikaan restriktio- paikka juuri ennen aloitus-AUG:tä prepro-NGF:n säätelysekvenssien ja koodaussekvenssien välisten välien pitämiseksi mahdollisimman luonnollisina. Syntetisoidaan kaksi oligonukleotidiä: ensimmäisellä, emästen 9122 ja 9147 välissä olevalla (Ullrich, A., Nature 303:821, 1983) tulisi olla seuraava sekvenssi:

Met Ser Met Leu Phe

5'GCATAGCGTA ATG TCC ATG TTG TTC T₃

Aloitus-AUG:n edellä olevat emäkset muunnetaan, kuten yllä mainittiin, ja sitten syntetisoidun oligon sekvenssi on seuraava:

Xbai Met Ser Met Leu Phe

5'TGT CTAG AGT ATG TCC ATG TTG TTC T₃

Tätä oligonukleotidiä kutsutaan nimellä (Xbai). Toinen oligonukleotidi, joka käsittää emäkset asemien 9521 ja 9342 välillä (Ullrich, A., Nature 303:821, 1983) on komplementaarinen tämän sekvenssin suhteen PCR:n mahdollistamiseksi ja sen sekvenssi on seuraava:

ECORI

5'GGCGG AATT CTCGGTGGTGGAC₃

Tämä oligonukleotidi sisältää sisäpuolellaan ECORI-paikan, joka pystyy mahdollistamaan prepro-NGF:n liittämisen täysin kehittyneeseen NGF:ään. Tätä oligonukleotidiä kutsutaan nimellä (ECORI).

Nämä kaksi oligonukleotidiä syntetisoidaan oligonukleotidisyntetisoijalla kiinteässä faasissa fosforiamidiittien menetelmällä noudattamalla 330B DNA-syntetisoijan (toimittaja Biosystems, USA) vakiotoimenpiteitä. Ne (a) käsitellään

55°C:ssa 12 tunnin ajan NH₃:ssa, (b) saatetaan kuiviin tyhjösentrifugissa, (c) suspendoidaan uudelleen ammoniumasetaattiin, 2,5 M, (d) saostetaan 3 tilavuusmäärällä kylmää etanolia (-20°C), ja (e) pestään uudelleen 80%:isella kylmällä etanolilla ja suspendoidaan uudelleen veteen. Näiden kahden oligonukleotidin konsentraatio arvioidaan spektrofotometrillä. Laajennustoimenpide suoritetaan laitteella Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler Amplificator ja laajennukseen käytetyt reagenssit ovat vastaaviin DNA™ Amplyfer-varusteisiin (Perki Elmer-Cetus) kuuluvia reagensseja. Lyhyesti käytetään seosta, jossa on 200 µM kumpaakin oligonukleotidiä, 0,5 µM jokaista dATP-, dTTP-, dCTP-, dGTP-oligonukleotidiä ja 0,1 µg ihmisen DNA:ta, ja reaktiopuskuria 100 µl:n koko seoksessa, jossa on 0,5 U TAQ-polymeraasia, ja tämä kaikki on peitetty parafiiniöljyllä haihtumisen estämiseksi. Laajennusreaktio suoritetaan käyttämällä kojetta 35 syklin ajan ihmisen DNA:n yhteydessä. Sykli on kummassakin tapauksessa seuraava: 1 minuutti 94°C:ssa, 2 minuuttia 45°C:ssa, 3 minuuttia 72°C:ssa. 300 emäsparin laajennettu fragmentti puhdistettiin Low Melting Agarose- (NuSieve) geelissä käyttämällä GENE CLEAN™-varusteita (BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA), agarosin liuottamiseksi. DNA leikataan XbaI- ja EcoRI-restriktioentsyymeillä ja puhdistetaan uudelleen yllä esitetyllä tavalla. Näin puhdistettu fragmentti kloonataan pGEM4-vektorin (Promega) XbaI- ja EcoRI-paikkoihin. Saatua plasmidia kutsutaan nimellä pGEM4Xba-NGF.

Tämä plasmidi (pGEM4Xba-NGF) leikataan HindIII-EcoRI:ssä ja 300 emäsparin fragmentti, kun se on puhdistettu, kloonataan pUC18BBG26-vektorin (British Biotechnology Ltd., Oxford, UK) HindIII-EcoRI-paikkoihin. pUC18BBG26 sisältää kasetti-rakenteisen hβ-NGF:n geenin, s.o. sen sekvenssin sisäpuolelle on luotu restriktiopaikkoja, jotka eivät ole luonnollisia, mikä mahdollistaa määrättyjen alueiden korvaamisen, s.o. toisin sanoen ne mahdollistavat mutageneesin. Saatua vektoria kutsutaan nimellä pUC18hNGFC. Tämä vektori leikataan BamHI:llä ja laajennus kopioidaan kohdassa 5' Klenow-polymeraasilla.

Se leikataan XbaI:ssa ja 760 emäsparin fragmentti puhdistetaan agarosegeelillä. Tämä fragmentti kloonataan pMSG-ekspressiovektorin NheI- ja SmaI-paikkojen väliin. Kuviossa 2 on esitetty summittainen kaavio tämän vektorin aikaansaamiseksi, jota kutsutaan nimellä pMSGphNGF, kun taas saman vektorin kaaviomainen esitys on esitetty kuviossa 3.

B.3 NGF:n kloonaus metallotioneiinin valvonnassa

Tämä vektori valmistetaan, koska metallotioneiini IIa (MTIIa) voidaan indusoida Zn^{++} :lla tai Cd^{++} :lla tai muilla raskasmetalli-ioneilla, ja siten sen ekspressiota voidaan valvoa. Edelleen tämän promoottorin ekspression tehostamiseksi, SV40-vahvenninta lisätään MTIIa:n promoottorin 5'-päässä samalla, kun SV40:n pientä t-antigeeniä ja polyA:ta käytetään silmukointiin ja polyadenylointiin. Ensiksi metallotioneiinin promoottori liitetään prepro-h β -NGF:ään seuraavasti: metallotioneiinin promoottori eristetään plasmidista (phMTIIa) leikkaamalla restriktioentsyymeillä HindIII ja BamHI (Karin, H., Nature 299:797, 1982), promoottorin käsiteltävä 841 emäsparin fragmentti kloonataan pGEM4-vektorin (Promega Madison, WI, USA) paikkoihin HindIII-BamHI. Tätä vektoria kutsutaan nimellä pGEM4hMTIIa. Tämä promoottoriosa laajenee kohtaan 3' muutamilla luonnollisilla kodoneilla, sisältää AUG-metioniinin ensimmäisen kodonin ja välittömästi tämän jälkeen havaitaan BamHI-restriktiopaikka. prepro-h β -NGF:n kloonauksen mahdollistamiseksi tämän promoottorin valvonnassa käyttämällä hMTIIa:n promoottorin aloitusmetioninia muodostetaan oligonukleotidi emästen 9133 ja 9160 väliin (Ullrich, A., Nature 303:821, 1983), joka saa aikaan BamHI-restriktiopaikan heti aloitus-AUG:n jälkeen, joka mahdollistaisi geenin synkronoimisen. Syntetisoitu oligonukleotidi, jonka sekvenssi on seuraava:

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile
5'TG TCC ATG TTG TTC TAC ACT CTG ATC AC₃

muunnetaan seuraavaksi sekvenssiksi:

BamHI

5'TGG ATCC ATTGTTCTACACTCTGATCAC₃

Tätä oligonukleotidiä kutsutaan nimellä BamHI. Muuttuneet emäokset käsittävät myös aminohapposekvenssien muutoksen. Itse asiassa 2. ja vastaavasti 3. aminohappo muuttuvat Asp:stä Ser:iksi ja vastaavasti Pro:sta Met:iksi. Kuitenkaan täällä muutoksella ei ole paljon vaikutusta hydropatisiteettiprofiiliin ja molekyyli erittyy normaalisti.

Tätä oligonukleotidiä käytetään yhdessä EcoRI-oligonukleotidin kanssa prepro-NGF:n laajentamiseksi yllä esitetyllä tavalla. Puhdistettu fragmentti leikataan BamHI:ssä ja EcoRI:ssä ja kloonataan sitten pGEM4HMTIIa-vektorin BamHI- ja EcoRI-restriktiopaikkojen väliin. Vektoria kutsutaan nimellä pGhMTphNGF.

SV40:n vahventimen (aktivaattorin) aikaansaamiseksi SV40 otetaan PMSGphNGF-plasmidista seuraavasti: PMSGphNGF-vektori leikataan BamHI:ssä ja sitten laajennus kopioidaan kohdassa 5' Klenow-polymeraasilla. Sitten se leikataan HindIII:lla ja 500 emäsparin fragmentti kloonataan pGEM3:een NaeI- ja HindIII-restriktiopaikkojen väliin. Saatua vektoria kutsutaan nimellä pGSV40.

Ekspressiovektorin aikaansaamiseksi yllä mainitut palaset liitetään fragmenttien kolmoisyyhtymänä seuraavasti: pMSGphNGF-vektori leikataan EcoRI- ja BamHI-restriktioentsyymeillä ja 1500 emäsparin fragmentti puhdistetaan. pGhHTphNGF-vektori leikataan HindIII-EcoRI-entsyymeillä ja 1100 emäsparin fragmentti puhdistetaan. Nämä kaksi fragmenttia kloonataan yhdessä pGSV40-vektorissa HindIII- ja BamHI-restriktiopaikkojen väliin. Kuviossa 4 on esitetty summittainen kaavio tämän ekspressiovektorin aikaansaamiseksi, jota kutsutaan nimellä pSV40MTphNGF, kun taas saman vektorin kaaviomainen esitys on esitetty kuviossa 5.

Tämä vektori, pSV40MTphNGF, on liitetty stabiilisti CHO KIsoluihin kaksoistransfektiona yhdessä pSV2Neo-plasmidin

kanssa ja valitaan yllä esitetyllä tavalla neomysiinillä G418 (GIBCO, BRL), 1 mg/ml. Tämä plasmidi kotransfektoidaan phMT-plasmidilla kolonioiden valinnan aikaansaamiseksi, jotka sisältävät suuren määrän kopioita. Tässä tapauksessa CHO KI-solut käsitellään 24 tunnin ajan 50 mN:ssä sinkkisulfaattia metallotioneiinin synteessin käynnistämiseksi ja valitaan kadmiumkloridilla lähtemällä 2,5 μM :n - 20 μM :n konsentraatiosta. Suuren määrän hNGF:n kopioita sisältäviä soluja käytetään molekyylin ekspressoimiseksi.

B.4 NGF:n kloonaukseen SV40:n promoottorivahventimen valvonnassa

pGEM4XbanF-plasmidi leikataan HindIII- ja EcoRI-restriktioentsyymeillä ja 300 emäsparin fragmentti korvataan pSV40 MT phNGF-vektorissa HindIII- ja EcoRI-restriktiopaikkojen välissä. Kuviossa 6 on esitetty summittainen kaavio tämän vektorin, pSV40phNGF:n aikaansaamiseksi, kun taas saman vektorin kaaviomainen esitys on esitetty kuviossa 7.

Tämä on konstitutiivinen vakiovektori, jossa säätelysekvenssit on määrätty SV40-promoottori/vahventimelle. Tämä vektori kotransfektoidaan stabiilisti CHO KI-soluihin pSV2Neo-plasmidilla ja hermokasvutekijän β -polypeptidiä tuottavat kloonit analysoidaan.

Valinta CHO KI dhfr-soluissa

Edellä olevan vektorin geenilaajennuksen aikaansaamiseksi CHO KI Dhfr-soluissa, vektori modifioidaan tämän jälkeen kloonamalla DHFR+:n geeni vastavirtaan hNGF:n geenistä. DHFR+:n koodaava pSV2dhfr-vektori leikataan HindIII:ssa ja sitten laajennus kopioidaan kohdassa 5' polymeraasilla. Sitten se leikataan BamH:ssa ja 1800 emäsparin fragmentti kloonataan XhoI-restriktiopaikoissa, jotka on leikattu polymeraasilla yllä esitetyllä tavalla, ja BamHI:ssa pSV40hNGF-vektorissa. Tällä tavalla saadaan aikaan pSV40hNGF-ekspresso-valintaplasmi. Kuviossa 8 on esitetty summittainen kaavio tämän vektorin aikaansaamiseksi.

Tämä plasmidi transfektoidaan normaalisti CHO KI-soluihin alfa-MEM-alustalla, joka ei sisällä nukleosidejä, mutta jossa on 10 % naudan fetaalista seerumia. 2 päivän kuluttua solut trypsinoidaan ja saatetaan 1/10-osaan edellä olevasta konsentraatiosta ja laajennus aloitetaan 10 μM :lla MTX:ää (metotreksaattia) ja lopetetaan 500 μM :lla. Solut, jotka jäävät eloon MTX:n korkeimmissa konsentraatioissa, käytetään hNGF:n ekspressoointiin.

Biologisen aktiivisuuden määrittäminen

In vitro-tutkimukset biologisen aktiivisuuden määrittämiseksi CHO-solulinjan viljelyalustalla sen jälkeen, kun yksi kolmesta yllä esitetystä vektorista on siirretty, niiden stabiloinnin jälkeen suoritetaan fetaalisissa kromaffinooma-soluissa PC-12 (Greene L. A. et al., Rev. Neurosci. 3:353, 1982). Reaktion spesifisyys tarkastetaan käyttämällä viljelyalustaa, jossa transformoimattomat CHO-kannat kasvavat, tai estämällä viljelyalustassa läsnä olevan h β -NGF:n aktiivisuus hiirestä tai naudasta peräisin olevan NGF:n suhteen spesifisillä polyklonaalisilla vasta-aineilla. Nämä kolme solulinjaa, jotka on transformoitu ja stabiloitu yllä esitetyillä yksilöllisillä vektoreilla, tuottavat ihmisen NGF:n β -alayksikön biologisesti aktiivisessa muodossa.

Farmaseuttiset koostumukset

Keksinnön mukainen h β -NGF voidaan muodostaa valmisteeksi tunnettujen menetelmien mukaisesti farmaseuttisesti käyttökelpoisten koostumusten valmistamiseksi. Farmaseuttisten koostumusten valmistus, jotka sisältävät yhdistelmä-DNA:sta johdettua ihmisen NGF-molekyyliä (β -alayksikköä), joka on esitetty tässä suhteessa ilman gangliosidejä ja fosfolipidejä ja mahdollisesti myös niiden kanssa, käsittää jo tunnetut menetelmät koostumusten valmistamiseksi, jotka ovat farmaseuttisesti käyttökelpoisia ja joita voidaan antaa potilaalle, jolloin on mahdollista yhdistää hNGF-molekyylin vaikuttava määrä seokseksi farmaseuttisesti sopivan apuaineen

kanssa. Sopivia apuaineita ja niiden valmistusta, jotka käsittävät muita proteiineja, on esitetty esimerkiksi julkaisussa "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 1985). Nämä apuaineet käsittävät injektoitavia "deposit-valmisteita".

Yllä olevaan perustuen farmaseuttinen valmiste käsittää, vaikkakaan ei yksinomaan, hermokasvutekijän liuoksia tai sen jäädytyskuivatettuja jauheita yhdessä yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän apuaineen tai laimentimen kanssa, jotka on puskuroitu sopivaan pH-arvoon ja ovat isoosmoottisia fysiologisten nesteiden kanssa. Jäädytyskuivatettujen valmisteiden kohdalla voidaan käyttää tukitäyteaineita, kuten esimerkiksi, joskaan ei yksinomaan, mannitolia tai glysiiniä, ja saadaan aikaan halutun määrän sisältäviä, sopivasti puskuroituja liuoksia riittävän isotonisten puskuroitujen, halutun pH-arvon omaavien liuosten valmistamiseksi. Samanlaisia liuoksia voidaan käyttää yhdistelmä-DNA:sta saadun hermokasvutekijän molekyylin farmaseuttisten koostumusten farmaseuttisia liuoksia varten halutun määrän sisältävissä isotonisissa liuoksissa ja ne käsittävät, joskaan eivät yksinomaan, fysiologisten puskuroitujen liuosten käytön, jotka sisältävät fosfaattia tai sitraattia, sopivissa konsentraatioissa kulloinkin halutun pH-arvon, esimerkiksi neutraalin pH-arvon omaavien isotonisten farmaseuttisten valmisteiden valmistamiseksi.

Farmaseuttiset valmisteet käsittävät edelleen, kuitenkin rajoittumatta näihin, rektaaliseen käyttöön tarkoitettuja suppositorioita, joissa on jäädytyskuivatettuja täyteaineita, esimerkiksi vesiliukoisia, glykogelatiini-tyyppisiä autoemulsiiveja tai muita. Näissä valmisteissa yhdistelmä-DNA:sta saatua hermokasvutekijää voi olla läsnä 0,01 % - 1/1 paino-% koko täyteaineesta. Suppositoriot voivat sisältää, rajoittumatta kuitenkin näihin, sopivia määriä asetyylilisylaattia.

Nämä farmaseuttiset valmisteet on tarkoitettu oraaliseen, rektaaliseen, parenteraaliseen, paikalliseen, inhaloitavaan, intraserebraaliseen käyttöön. Tästä syystä ne ovat kiinteässä tai puolikiinteässä muodossa, esimerkiksi rakeina, tabletteina, gelatiinikapseleina, kapseleina, suppositorioina, pehmeinä gelatiinikapseleina. Parenteraalista ja intraserebraalista käyttöä varten voidaan käyttää muotoja, jotka on tarkoitettu intramuskulaariseen, subkutaaniseen käyttöön tai jotka ovat sopivia intravenoosisia tai intraserebraalisia infuusioita tai injektioita varten, ja tästä syystä ne voivat olla aktiivisten yhdisteiden liuoksia ja aktiivisten yhdisteiden jäädytyskuivatettuja jauheita, jotka yhdistetään yhden tai useamman täyteaineen tai laimentimen kanssa, jotka ovat farmaseuttisesti hyväksyttäviä, sopivat yllä mainittuihin käyttötarkoituksiin ja joiden osmoottisuus sopii yhteen fysiologisten nesteiden kanssa. Paikallista käyttöä varten rasvojen tai voiteiden muodossa olevia valmisteita voidaan käyttää tooppisesti. Inhalointiin voidaan käyttää valmisteita sumutteiden, esimerkiksi nenäsumutteiden muodossa.

Keksinnön mukaisia valmisteita voidaan antaa ihmisille tai eläimille. Ne sisältävät edullisesti 0,01 - 10 % aktiivista komponenttia liuoksissa, sumutteissa, voiteissa tai rasvoissa ja 1 - 100 % ja etenkin 5 - 50 % aktiivista yhdistettä kiinteässä muodossa olevissa valmisteissa. Annettava annostus riippuu indikaatiosta, halutusta vaikutuksesta ja valitusta antotavasta.

Keksintö käsittää myös gangliosidien tai johdannaisten ja hermokasvutekijän NGF β -alayksikön kaikkien uusien kompleksien terapeuttisen käytön yllä jo mainituissa indikaatioissa. Ihmisten päivittäinen annostus injektioilla (subkutaanisesti tai intramuskulaarisesti tai intraserebraalisesti) on 0,05 - 5 mg aktiivista ainetta/kg.

On selvää, että näitä menetelmiä voidaan muunnella monin tavoin. Tällaisia muunnelmia ei tule pitää poikkeamina keksinnön hengestä ja puitteista ja kaikki tällaiset muunnelmat

lienevät selviä alan ammattihenkilölle ja ne kuuluvat seuraavien patenttivaatimusten puitteisiin.

Patenttivaatimukset:

1. Replikoitava ekspressiovektori ihmisen β -NGF:n ilmentämiseksi sopivissa nisäkässoluissa, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

- 5 i) ensimmäisen DNA-sekvenssin, joka koodaa ihmisen prepro-NGF:ää, jolloin sanottu ihmisen prepro-NGF alkaa tähteestä -121 ja jatkuu tähteeseen +118, ja
- 10 ii) promoottori-vahvennin-säätelyelementin, joka on liitetty suoraan ensimmäisen DNA-sekvenssin 5'-päähän.

2. Replikoitava ekspressiovektori ihmisen β -NGF:n ilmentämiseksi sopivissa nisäkässoluissa, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

- 15 i) ensimmäisen DNA-sekvenssin, joka koodaa ihmisen prepro-NGF:ää, jolloin sanottu ihmisen prepro-NGF alkaa tähteestä -121 ja ulottuu tähteeseen +118, mutta jossa tähde -120 on Asp ja tähde -119 on Pro,
- 20 ja
- ii) promoottori-vahvennin-säätelyelementin, joka on liitetty suoraan ensimmäisen DNA-sekvenssin 5'-päähän.

25 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen replikoitava ekspressiovektori, t u n n e t t u siitä, että säätelyelementti on ihmisen metallotioneiini-IIa (hMTIIA)-promoottori.

30 4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen replikoitava ekspressiovektori, t u n n e t t u siitä, että säätelyelementti on SV40-promoottori.

35 5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen replikoitava ekspressiovektori, t u n n e t t u siitä, että säätelyelementti on MMTV-promoottori.

6. Rekombinantti-DNA-plasmidi, t u n n e t t u siitä,

että sillä on rakenne pMSGphNGF (ks. kuviot 2 ja 3).

7. Rekombinantti-DNA-plasmidi, t u n n e t t u siitä, että sillä on rakenne pSV40MTphNGF (ks. kuviot 4 ja 5).

5

8. Rekombinantti-DNA-plasmidi, t u n n e t t u siitä, että sillä on rakenne pSV40phNGF (ks. kuviot 6 ja 7).

9. Rekombinantti-solulinja, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisella ekspressiovektorilla.

10

10. Menetelmä ihmisen β -NGF:ää koodaavan ekspressiovektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä yhdistelmästä, että

15

a) valmistetaan XbaI-oligonukleotidi, jolla on sekvenssi 5'TGT CTAG AGAT ATG TCC ATG TTG TTC T 3',

b) valmistetaan EcoRI-oligonukleotidi, jolla on sekvenssi

5'GGCGG AATT CTCGGTGGTGGAC 3',

20

c) kloonataan XbaI- ja EcoRI-oligonukleotidit pGEM4-vektoriin XbaI- ja EcoRI-restriktiokohtien kohdalla pGEM4Xba-NGF-plasmidin muodostamiseksi,

d) leikataan pGEM4Xba-NGF-plasmidi HindIII:n ja EcoRI:n kohdalta ensimmäisen 300 bp:n fragmentin muodostamiseksi,

25

e) kloonataan ensimmäinen 300 bp:n fragmentti pUC18BBG26-plasmidin HindIII-EcoRI-kohtiin pUC18hNGFc:n tuottamiseksi,

f) leikataan pUC18hNGFc BamHI:n ja XbaI:n kohdalta 760 bp:n fragmentin tuottamiseksi,

30

g) kloonataan 760 bp:n fragmentti pMSG-vektorin NheI- ja SmaI-kohtiin pMSGphNGF-plasmidin tuottamiseksi,

h) eristetään fragmentti, joka sisältää metallotioneiini IIa- (MTIIa) -promoottorin leikkaamalla phMTIIa HindIII:lla ja BamHI:llä,

35

i) kloonataan MTIIa-promoottoria sisältävät fragmentit pGEM4-vektoriin HindIII- ja BamHI-kohtien kohdalle pGEM4hMTIIa-vektorin muodostamiseksi,

- j) leikataan prepro-NGF-DNA-sekvenssi BamHI:lla ja EcoRI:llä, ja kloonataan saatava fragmentti pGEM4hMTIIa:n BamHI- ja EcoRI-restriktiokohtien väliin pGhMTphNGF:n tuottamiseksi,
- 5 k) leikataan pMSGphNGF BamHI:lla, kopioidaan 5'-jatke Klenowin polymeraasilla, leikataan HindIII:lla ja kloonataan saatavan 500 bp:n fragmentti pGEM3:n NaeI- ja HindIII-kohtien välille PGSV40:n tuottamiseksi ja
- 10 l) leikataan pGhMTphNGF HindIII:lla ja EcoRI:llä ensimmäisen fragmentin tuottamiseksi, leikataan pMSGphNGF EcoRI:llä ja BamHI:llä toisen fragmentin tuottamiseksi, ja kloonataan ensimmäinen ja toinen fragmentti pGSV40:n HindIII- ja BamHI-kohtien väliin pSV40MTphNGF:n tuottamiseksi.

15

11. Menetelmä ihmisen β -NGF:n tuottamiseksi, t u n -
n e t t u siitä, että

- i) transformoidaan nisäkässolu jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisella plasmidilla,
- 20 ii) kasvatetaan transformoitu solu ja
- iii) otetaan talteen kasvatuksessa tuotettu ihmisen β -NGF.

25

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että isäntäsolu on CHO-solu.

30

13. Patenttivaatimuksen 11 tai 12 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu transformoidaan patenttivaatimuksen 7 mukaisella plasmidilla.

14. CHO-solu, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu vaatimuksen 6 mukaisella vektorilla.

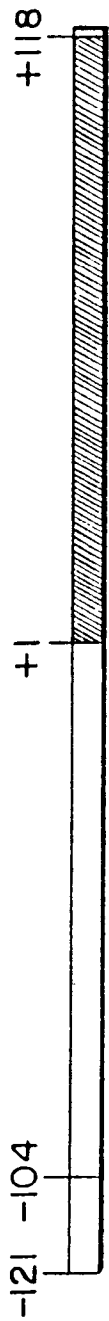
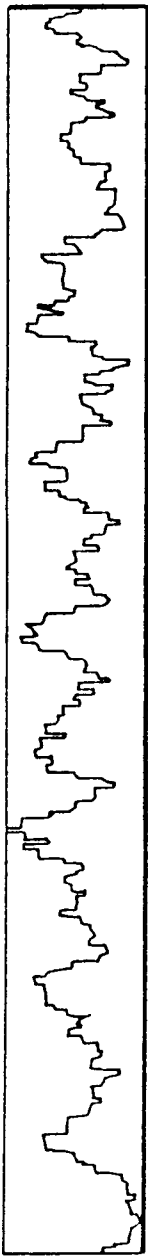


FIG.1

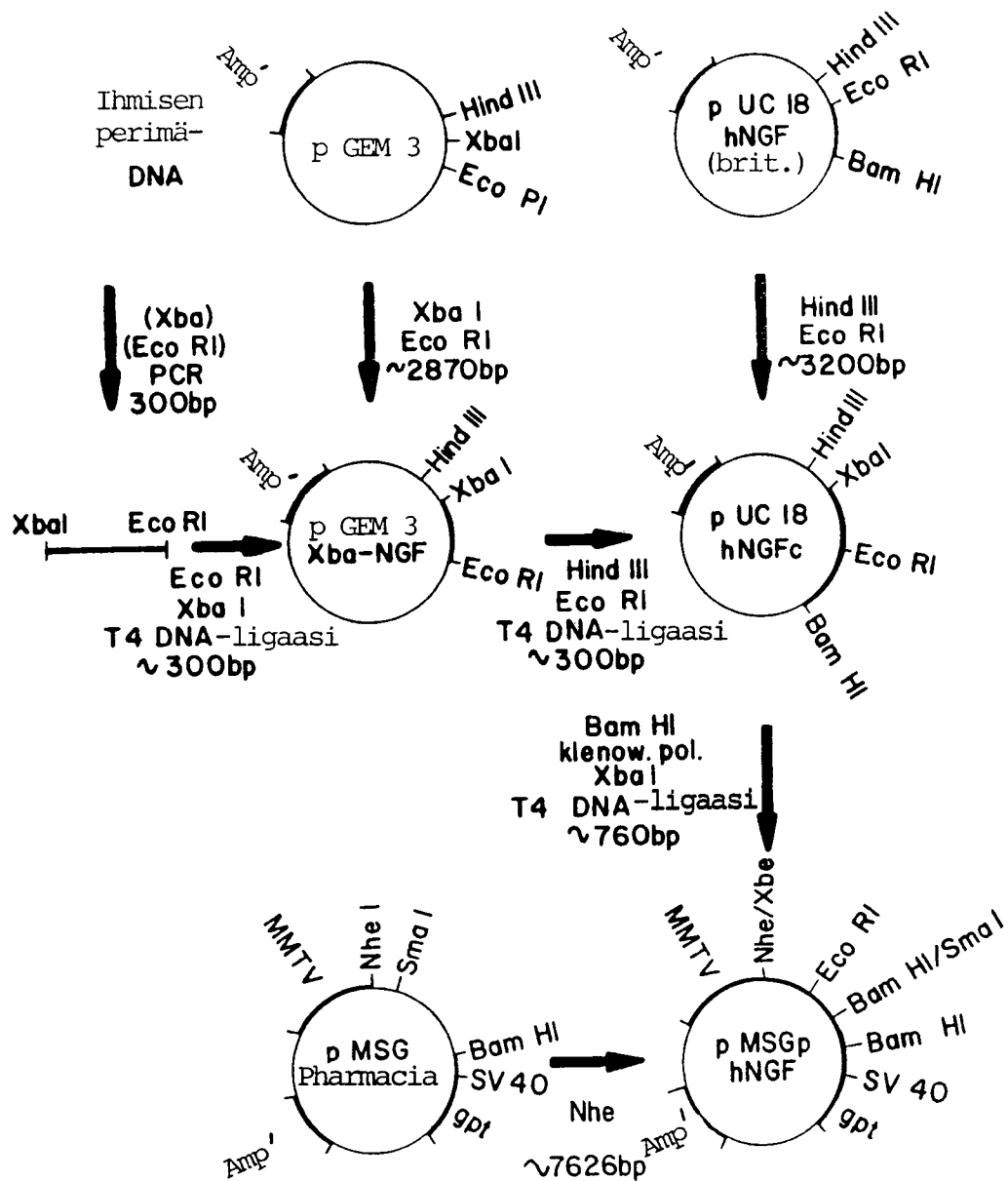


FIG.2

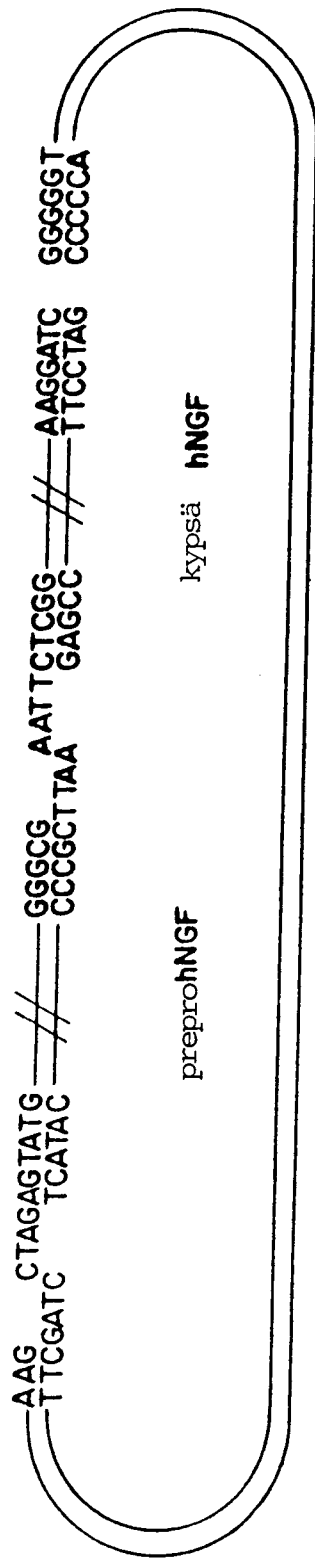


FIG.3

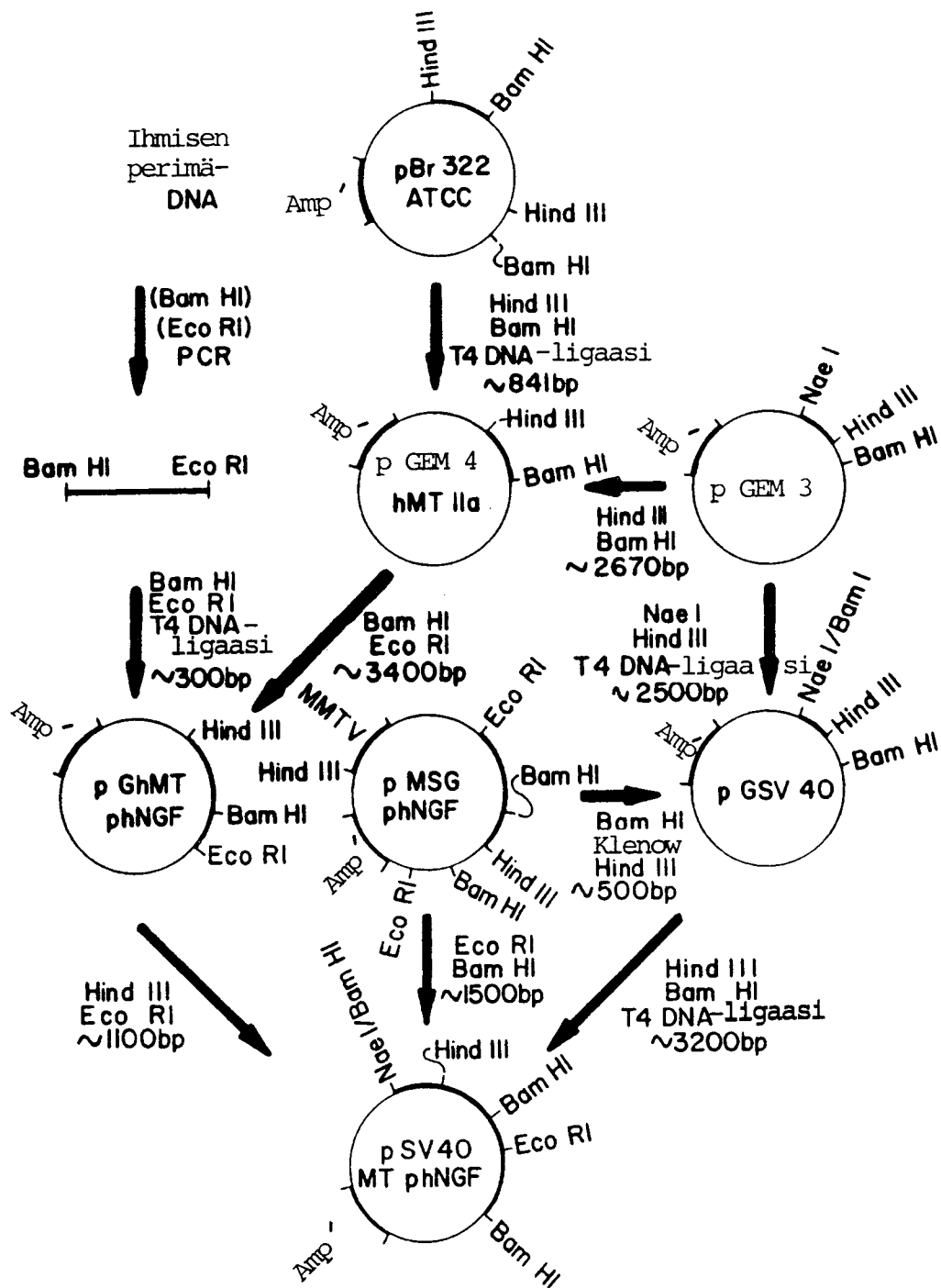


FIG.4

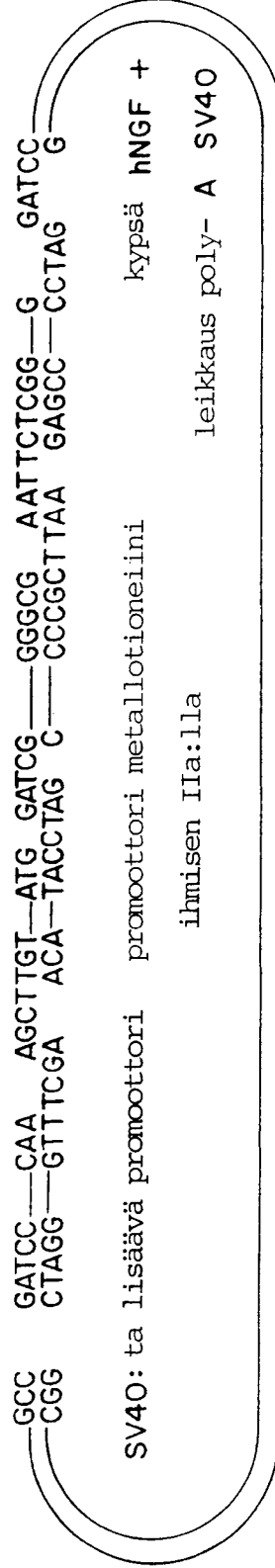


FIG.5

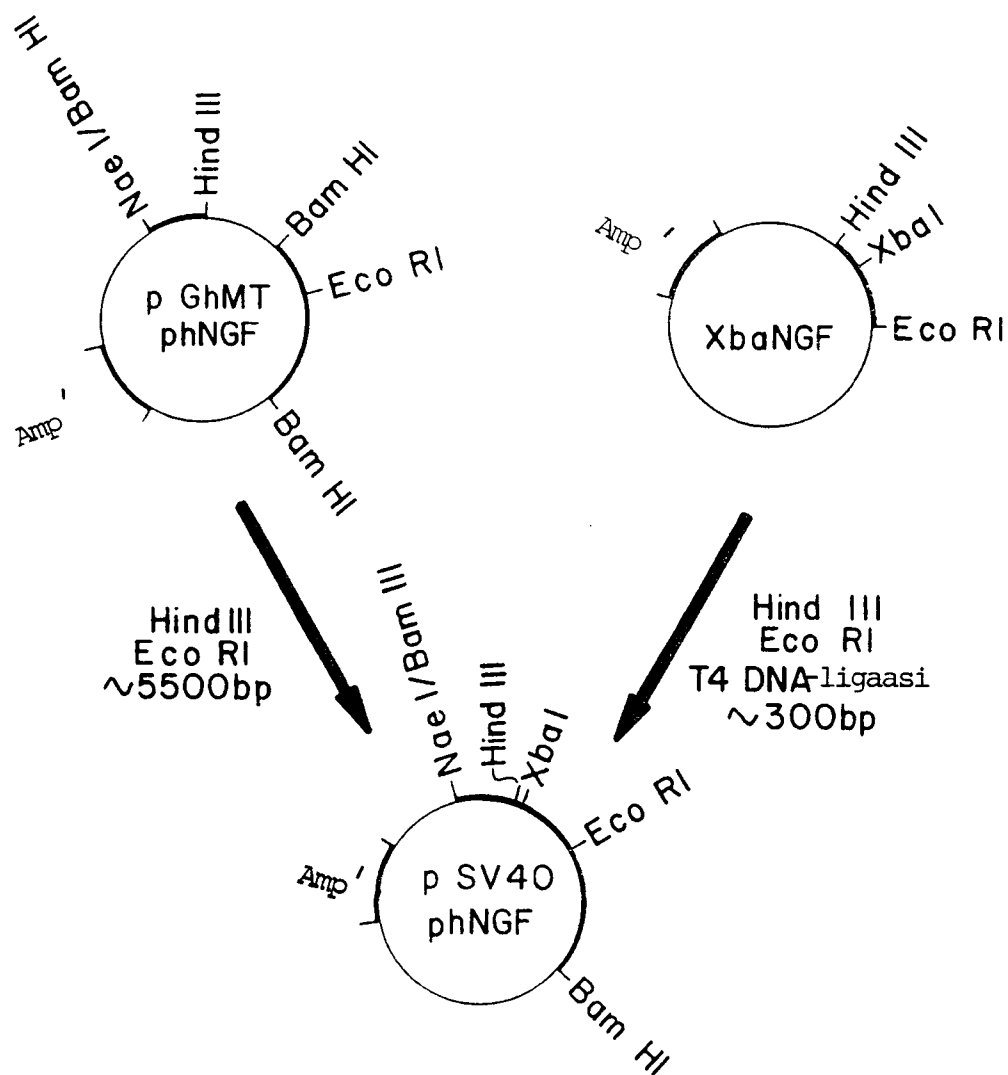


FIG.6

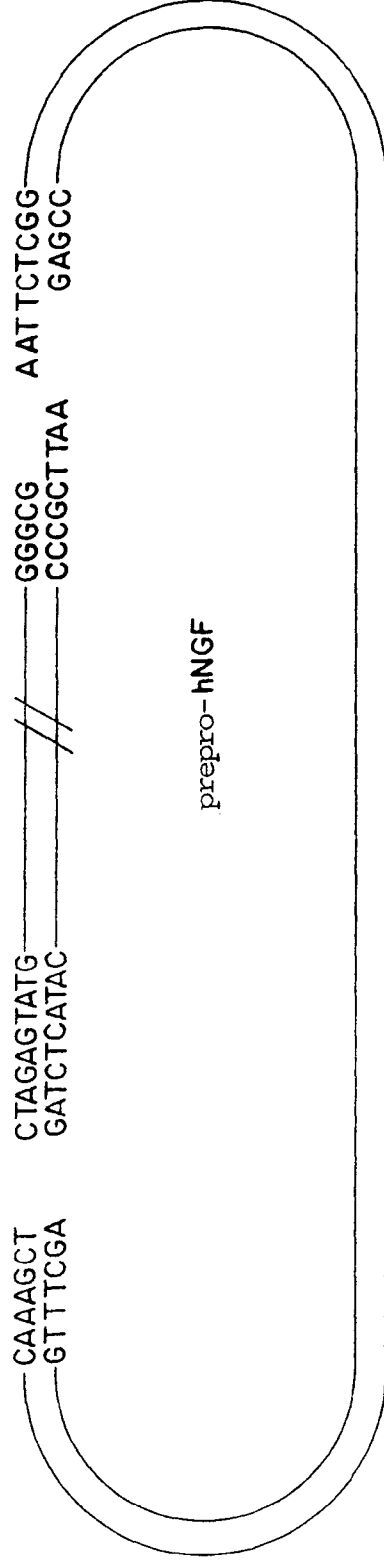


FIG.7

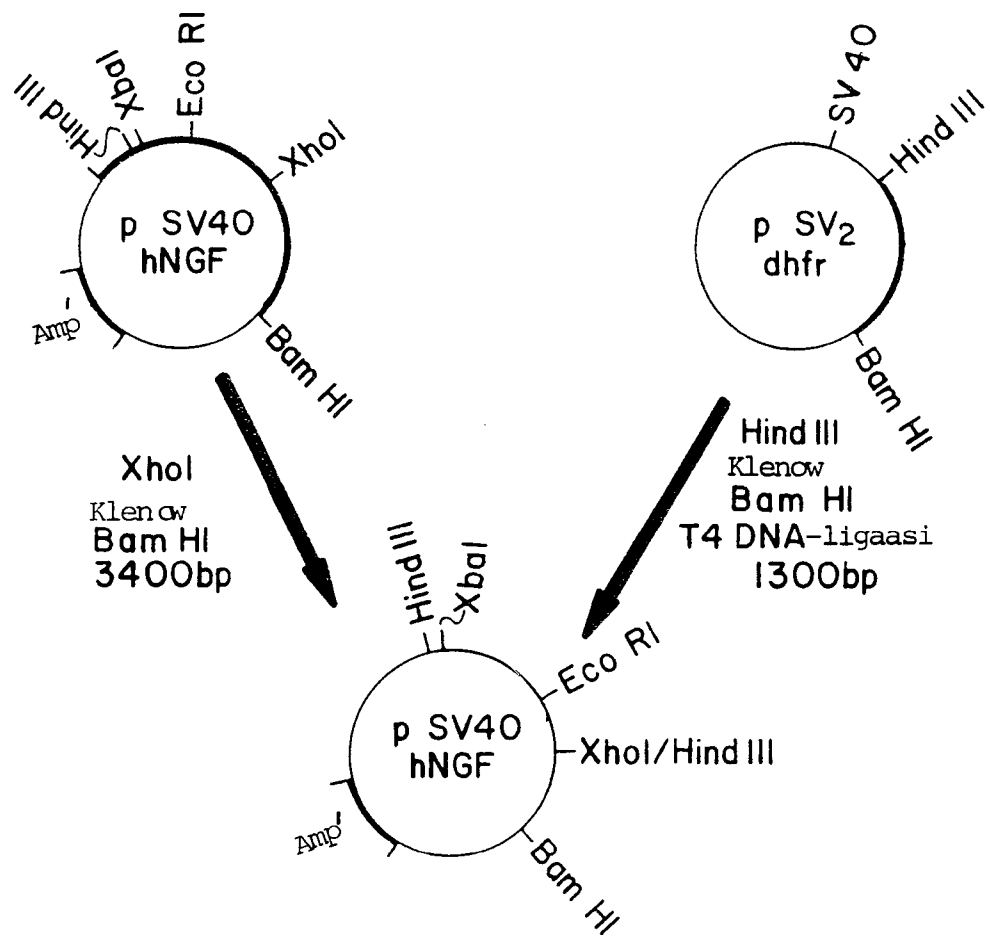


FIG.8