



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **257 271 A1**

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 299 337 6	(22)	20.01.87	(44)	08.06.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Kiessling, Udo, Dr. rer. nat.; Platzer, Mathias, Dr. rer. nat.; Strauss, Michael, Dr. rer. nat., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von menschlichem Wachstumshormon (Somatotropin)
------	---

(55) Biotechnologie, Wachstumshormon (Somatotropin), Plasmid, Polyomavirus, Polyoma-Promoter, Adeno-Promoter, Kalziumphosphat-Kopräzipitation, Replikationshelferzelllinie, Polyoma-GroßT-Antigen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von menschlichem Wachstumshormon (Somatotropin = STH) aus einer tierischen Zellkultur. Sie ist sowohl in der biologischen Grundlagenforschung als auch in der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie einsetzbar. Erfindungsgemäß wird eine aus menschlichen Zellen isolierte DNA, die STH kodiert, unter Verwendung eines geeigneten Vektors in tierischen Zellen zur Expression gebracht und das nach Sekretion erhaltene STH aus dem Kulturmedium mit bekannten Methoden isoliert. Als Vektor findet ein in tierischen Zellen selektierbares und replikationsfähiges Plasmid mit der Replikationsstartregion („origin“) des Polyomavirus Anwendung. Es wird ein rekombinantes Plasmid mit dem STH-Gen unter Kontrolle eines fremden Promoters, vorzugsweise des späten Polyoma-Promoters oder eines späten Adeno-Promoters, hergestellt und durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation oder mit Hilfe von Polykationen in tierische Zellen eingeschleust. Als Zelllinie wird eine Replikationshelferzelllinie mit endogenem Polyoma-GroßT-Antigen verwendet. Man erhält ein Produkt von höchster Reinheit ohne pyrogene und virale Kontaminationen sowie mit voller biologischer Aktivität.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von menschlichem Wachstumshormon (Somatotropin = STH), **dadurch gekennzeichnet**, daß eine aus menschlichen Zellen isolierte DNA, die STH kodiert, unter Verwendung eines geeigneten Vektors in tierischen Zellen zur Expression gebracht wird, und das nach Sekretion erhaltene STH aus dem Kulturmedium mit an sich bekannten Methoden isoliert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als STH-kodierende DNA die genomische Sequenz aus menschlichen Zellen verwendet wird, vorzugsweise als 2,6kb-EcoRI-Fragment oder als 2,15kb-Bam/EcoRI-Fragment.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Vektor ein in tierischen Zellen selektierbares und replikationsfähiges Plasmid mit der Replikationsstartregion („origin“) des Polyomavirus verwendet wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das STH-Gen in dem replizierbaren Vektor unter Kontrolle eines fremden Promoters, vorzugsweise des späten Polyoma-Promoters oder eines späten Adeno-Promoters, gebracht wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein rekombinantes Plasmid mit dem STH-Gen unter Kontrolle eines fremden Promoters herstellt und in tierische Zellen einbringt, vorzugsweise durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation, mittels DEAE-Dextran, Polybrene, Protoplastenfusion, Elektroporation oder Mikroinjektion.
6. Verfahren nach Punkt 1 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Zelllinie eine Replikationshelferzelllinie mit endogenem Polyoma-Groß-T-Antigen, vorzugsweise exprimiert unter Kontrolle eines regulierbaren Promoters, verwendet wird.
7. Verfahren nach Punkt 1, 5 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß Kolonien mit dem rekombinanten STH-Plasmid selektiert werden und die Kopiezahl des replizierenden Plasmids durch Induktion des Groß-T-Antigens, vorzugsweise mittels Steroidhormon, erhöht wird.
8. Verfahren nach Punkt 1 und 5–7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Kulturmedium nach Erreichen der maximalen Zelldichte durch ein serumfreies Kulturmedium ersetzt und das STH nach weiteren 1–3 Tagen Kultivierung in an sich bekannter Weise isoliert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von menschlichem Wachstumshormon (Somatotropin = STH). Sie ist sowohl in der biologischen Grundlagenforschung als auch in der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie einsetzbar.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Menschliches Wachstumshormon (STH) wurde seit vielen Jahren aus Hypophysen von Leichen gewonnen. In den letzten Jahren wurden mehrere Fälle von Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung mit der Gabe von derartigen Wachstumshormon-Präparaten in Verbindung gebracht (Lancet 1985, S. 1172; Bericht von Kabi Vitrum vom 13. 5. 85). Deshalb verlangt die Medizin ein Präparat, bei dem virusartige Kontaminationen nicht auftreten. Mit der Einführung der Gentechnik in die Biotechnologie ist es prinzipiell möglich, Proteinwirkstoffe aus gentechnisch manipulierten Organismen zu gewinnen. So gibt es auch Patente zur Gewinnung von Wachstumshormon aus *E. coli* (DDR-AP 157343, DDR-AP 212403). Ein derartiges Verfahren hat aber den Nachteil, daß vor die erste natürliche Aminosäure des reifen Proteins die Aminosäure Methionin gesetzt werden mußte (Met-STH), da einerseits das natürliche Prähormon in *E. coli* nicht effektiv transportiert und prozessiert wird und andererseits die Proteinsynthese immer mit Methionin starten muß. Bei dem genannten Verfahren kam eine cDNA zur Anwendung deren 5'-Ende durch synthetische Oligonukleotide modifiziert wurde (Goeddel et al. 1979, Nature 281, 544).

Das bereits als Medikament zugelassene Met-STH induziert nachweislich bei einem erheblichen Teil der behandelten Personen die Bildung von Antikörpern (Serono-Konferenz 7. 11. 85, Frankfurt [Main]). Damit wird bei diesen Patienten der Behandlungserfolg in Frage gestellt.

Die Alternative zum Met-STH besteht in der Ausnutzung der Proteintransport-Maschinerie höherer Organismen, welche die beim Wachstumshormon vorhandenen Signalsequenz während des Transports aus der Zelle korrekt abspalten können. Tierische Zellen werden mit Erfolg für die Gewinnung von Proteinen mit Signalsequenzen eingesetzt. Die natürlichen Produkte können dabei leicht aus dem Kulturmedium gewonnen werden (z. B. beim Gewebeplasminogenaktivator: DDR-AP 210303; beim Hepatitis B-Oberflächenantigen: EP 0105141). Die Gewinnung von Wachstumshormon aus der tierischen Zellkultur ist bisher jedoch nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Herstellung von reinem, therapeutisch ohne Nebenwirkung einsetzbarem Wachstumshormon bei ökonomisch vertretbarem Aufwand. Der Weg dazu ist die Entwicklung eines Verfahrens zur Gewinnung von STH aus gentechnisch manipulierten tierischen Zellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Entwicklung eines Verfahrens zur Gewinnung von menschlichem STH aus einer tierischen Zellkultur durch Transfer des isolierten SH-Gens mittels eines geeigneten Vektors in Replikationshelferzellen, die eine Regulierung der STH-Genkopiezahl ermöglichen und damit die nachfolgende Expression des transferierten Gens.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine aus menschlichen Zellen isolierte DNA, die STH kodiert, unter Verwendung eines geeigneten Vektors in tierischen Zellen zur Expression gebracht wird, und das nach Sekretion erhaltene STH aus dem Kulturmedium mit an sich bekannten Methoden isoliert wird. Dabei werden im einzelnen folgende Verfahrensschritte durchgeführt:

1. Komplette genomische DNA menschlicher Zellen wird mit EcoRI teilweise gespalten und in lambda-Phagen kloniert. Als menschliche Zellen werden primäre embryonale Lungenfibroblasten verwendet.
2. Die erhaltenen Phagen-Rekombinanten werden auf Agar ausplattiert, und ca. 2 Mio Plaques werden auf Nitrozellulose-Filter überführt. Die auf den Filtern fixierte DNA wird der Hybridisierung mit einem ³²P-markierten, STH-sequenzspezifischen Oligonukleotid unterzogen. Ein Oligonukleotid 5'-AGGCTGCGGGGTTCTGCAG-3' entspricht der publizierten STH-Sequenz (Seeburg, 1982, DNA 1, 239) zwischen den Nukleotiden 737 und 755 im kodogenen Strang.
3. Mehrere hybridisierungspositive Phagen-Rekombinanten werden der Restriktionsanalyse unterzogen. Ein STH-haltiger Klon muß ein 2,6 kbp-EcoRI-Fragment bzw. ein 2,15 kbp-EcoRI/BamHI-Fragment aufweisen (Seeburg, 1982, DNA, 1, 239). Das identifizierte Fragment wird in puC119 kloniert und der Sequenzanalyse unterzogen.
4. Das als STH-Gen identifizierte 2,15 kbp-Fragment wird in einen Vektor kloniert, der einen bakteriellen Replikationsstart (origin), ein bakterielles Selektionsgen, ein Selektionsgen für tierische Zellen und den Replikationsstartbereich (origin) des Polyomavirus enthält. Zusätzlich wird in diesen Vektor direkt vor das STH-Gen in den BamHI-Ort ein fremder Promoter (später Adeno-, später Polyoma-, Metallothionein- oder Immunoglobulin-Promoter) kloniert, der die Expression des STH-Gens steuern soll.
5. Die erhaltene Plasmidrekombinante wird vorzugsweise in eine Helfierzelle mit endogenem Polyoma-Groß-T-Antigen, welches die Replikation des origin-Vektors erlaubt, durch eine geeignete Transfertechnik (Kalziumphosphat, DEAE-Dextran, Poltbrene, Protoplastenfusion, Elektroporation oder Mikroinjektion) eingebracht und Transformanten werden mit Geneticin auf Anwesenheit des neomycin-Gens selektiert.
6. Zur Gewinnung von STH aus derartig selektierten Zellen werden diese in Rollerkulturflaschen, einem Hohlfasersystem, im Rührfermenter oder anderen geeigneten Zellzuchtgefäßen, in an sich bekannter Weise angezogen. Bis zur maximalen Zelldichte wachsen die Zellen im Medium mit 1-2% Kälberserum aufgrund der Wachstumsfaktor-ähnlichen Eigenschaften des Polyoma-Groß-T-Antigens. Anschließend werden sie mehrere Tage in serumfreiem Medium gehalten. Durch Zugabe von Dexamethason (10^{-6} M) wird über die Steigerung der Groß-T-Antigen-Synthese die Kopiezahl des Vektors und damit des STH-Gens wesentlich erhöht (10-20fach). Das Medium wird täglich bzw. kontinuierlich ausgetauscht.
7. Der qualitative und quantitative Nachweis erfolgt durch Immunpräzipitation mit STH-spezifischen polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern und anschließender Elektrophorese bzw. auch mittels Radioimmunassay.
8. Die Reinigung von STH aus dem serumfreien Kulturmedium erfolgt in an sich bekannter Weise.
9. Der Nachweis der Identität des Produkts wird durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz und durch den Tibia-Wachstumstest erbracht.

Man erhält ein Produkt von höchster Reinheit ohne pyrogene und virale Kontaminationen sowie mit voller biologischer Aktivität.