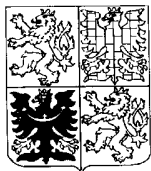


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.10.1990**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.10.1989**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1989/421444**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)

(21) Číslo dokumentu:

1990 - 4972

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/505

C 12 N 15/16

A 61 K 38/22

(71) Přihlašovatel:
KIRIN-AMGEN, INC., Lucerne, CH;

(72) Původce:
Strickland Thomas Wayne, Moorpark, CA, US;
Byrne Thomas Edward, Bethesda, MD, US;
Elliott Steven George, Thousand Oaks, CA, US;

(74) Zástupce:
Čermák Karel JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

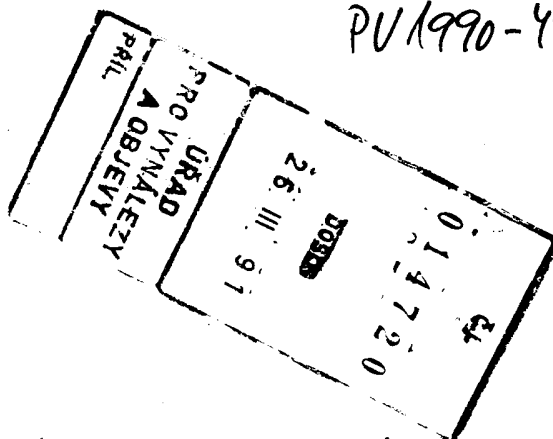
(54) Název přihlášky vynálezu:

Isoformy erythropoietinu

(57) Anotace:

Jsou popsány isoformy erythropoietinu, mající specifický počet sialových kyselin na molekulu erythropoietinu. Jsou také popsány směsi takových isoform, farmaceutické prostředky, obsahující takové isoformy nebo jejich směsi a způsoby přípravy isoform erythropoietinu.

CZ 1990 - 4972 A3



Isoformy erythropoietinu

Oblast techniky

Předložený vynález se týká isoform erythropoietinu nebo jejich směsí, způsobu přípravy specifických isoform nebo jejich směsí, farmaceutických přípravků, které tyto formy nebo jejich směsí obsahují a způsobu léčení za použití takových isoform a přípravků.

Dosavadní stav techniky

Erythropoietin je glykoproteinový hormon zjištěný při zrání erythroïdních progenitorových buněk na erythrocyty. Má podstatný význam při regulaci hladin červených krvinek v oběhu. Přirozeně se vyskytující erythropoietin je produkován játry během fetálního života a ledvinami u dospělých a cirkuluje v krvi a stimuluje produkci červených krvinek v kostní dřeni. Anemie je téměř vždy důsledek renálního poškození, působícího snížení produkce erythropoietinu v ledvinách. S rekombinantním erythropoietinu, produkovaném technikami genového inženýrství, zahrnujícími expresi proteinového produktu hostitelskými buňkami transformovanými genem kodujícím erythropoietin bylo zjištěno, že je účinný jestliže se použije při léčení anemie vzniklé z chronického renálního poškození.

Dosud byla dostupnost erythropoietinu velmi omezena. I když je protein přítomen v lidské moči, vylučovaná množství jsou příliš nízká pro praktický zdroj erythropoietinu pro terapeutické využití. Pacienti postižení aplastickou anemií vykazují zvýšení hladiny urinárního erythropoietinu ve srovnání se zdravými individui, ale omezené množství

takové moče rovněž činí tento zdroj nepraktickým. Purifikace lidského urinárního erythropoietinu podle Miyakeho a spol., J.Biol.Chem., 252, 5558 (1977), používá jako výchozí materiál moč od osob s aplastickou anémií.

Identifikace, klonování a exprese genů, kodujících erythropoietin je popsána v US patentu č. 4703008 Linnem. Popis purifikace rekombinantního erythropoietinu z buněčného media, podporujícího růst savčích buněk, obsahujících rekombinantní erythropoietinové plasmidy je např. zahrnuta v US patentu č. 4667016 aie a spol.. Exprese a získání biologicky aktivního rekombinantního erythropoietinu ze savčích hostitelských buněk, obsahujících erythropoietinový gen v rekombinantním plasmidu, poskytuje v první řadě dostatečné množství erythropoietinu vhodného pro terapeutické aplikace. Dále znalost genové sekvence a dostupnost větších množství purifikovaného proteinu umožňuje lepší pochopení působení tohoto proteinu.

Biologická aktivita proteinu je závislá na jeho struktuře. Nejmenší primární struktura proteinu (tj. jeho aminokyselinové sekvence) poskytuje informaci, která umožňuje formaci sekundární (např. α -helix nebo β -list) a terciární (trojrozměrné přehyby) struktury polypeptidu během a po jeho syntéze. Přerušování vlastních sekundárních a terciárních struktur zavedením mutací nebo chemickým nebo enzymatickým zpracováním, může vést ke snížení biologické aktivity.

V prokaryotních organismech jsou biologické aktivity proteinů z velké části ovládány výše uvedenými strukturami. Na rozdíl od proteinů z prokaryotních buněk je mnoho buněčných povrchů a sekretovaných proteinů produkováných v eukaryotních buňkách modifikováno jednou nebo více oligosacharidovými

skupinami. Tato modifikace označovaná jako glykosylace může výrazně ovlivnit fyzikální vlastnosti proteinů a může také být důležitá pro stabilitu proteinu, sekreci a subcelulární lokalizaci. Vlastní glykosylace může mít základní význam pro biologickou aktivitu. Některé geny z eukaryotních organismů, když jsou exprimovány v bakteriích (např. *E.coli*), které postrádají celulární procesy pro glykosylaci proteinů, poskytují proteiny, které mají malou nebo žádnou aktivitu díky nedostatku glykosylace.

Glykosylace se uskutečňuje při specifických místech podél polypeptidového hlavního řetězce a je obvykle dvou typů: O-vázané oligosacharidy jsou spojené se serinovými nebo threoninovými zbytky, zatímco N-vázané oligosacharidy jsou připojeny k asparaginovým zbytkům, jestliže jsou tyto části sekvence Asn-X-Ser/Thr, kde X může být jakákoliv aminokyselina s výjimkou prolinu. Struktury N-vázaných a O-vázaných oligosacharidů a cukrových zbytků nalezené v každém typu, jsou rozdílné. Jeden typ cukru je obvykle nalezen na obou, je jím N-acetylneuraminová kyselina (dále nazývaná jako sialová kyselina). Sialová kyselina je obvykle terminální zbytek obou N-vázaných a O-vázaných oligosacharidů a díky svému negativnímu náboji uděluje glykoproteinu kyselý charakter.

Jak lidský z moče získaný erythropoietin i rekombinantní erythropoietin (exprimovaný v savčích buňkách), mající aminokyselinovou sekvenci 1 - 165 lidského erythropoietinu, obsahují tři N-vázané a jeden O-vázaný oligosacharidový řetězec, kde tyto řetězce tvoří asi 40 % celkové hmotnosti glykoproteinu. N-vázaná glykosylace probíhá na asparaginových zbytcích, umístěných v polohách 24, 38 a 83, zatímco O-vázaná glykosylace probíhá na serinovém zbytku umístěném v poloze 126 (Lai a spol., *J.Biol.Chem.* 261,

3116 (1986); Broudy a spol. Arch.Biochem.Biophys. 265, 329 (1988). Oligosacharidové řetězce mohou být modifikovány terminálními zbytky sialové kyseliny. Enzymatické zpracování glykosylovaného erythropoietinu pro odstranění zbytků sialové kyseliny vede ke ztrátě in vivo aktivity, ale nepůsobí ztrátu aktivity in vitro (Lowy a spol., Nature 185, 102 (1960); Goldwasser a spol., J.Biol.Chem. 249, 4202 (1974)). Toto chování může být využito při rychlém odstranění asialoerythropoietinu z oběhu po interakci s hepatickým proteínem, který váže asialoglykoprotein (Morrell a spol. J.Biol.Chem. 243, 155 (1968); Briggs a spol. Am. J.Physiol. 227, 1385 (1974); Ashwell a spol., Methods Enzymol. 50, 287 (1978)). Erythropoietin tak vykazuje in vivo biologickou účinnost pouze když je sialylován a je tak zabráněno jeho vazbě hepatickým vazacím proteínem.

Úloha jiných složek v oligosacharidových řetězcích není definována dostatečně. Bylo zjištěno, že neglykosylovaný erythropoietin má velmi sníženou in vivo aktivitu ve srovnání s glykosylovanou formou, ale udržuje si aktivitu in vitro (Dordal a spol. Endocrinology 116, 2293 (1985); Linův patent výše). V další studii nicméně odstranění N-vázaných nebo O-vázaných oligosacharidových řetězců jednotlivě nebo společně mutagenesí asparaginových nebo serinových zbytků, které jsou glykosylačními místy, výrazně snižuje in vitro aktivitu přeměněného erythropoietinu, který je produkován v savčích buňkách (Dube a spol. J.Biol.Chem. 263, 17516 (1988)).

Glykoproteiny jako je erythropoietin mohou být separovány na různě nabitě formy za použití technik jako je isoelektrické fokusace (IEF). Jsou uváděny IEF studie surových či částečně purifikovaných erythropoietinových přípravků (Lukowsky a spol., J.Biochem 50, 909 (1972); Shelton a spol. Biochem. Med. 12, 45 (1975); Fuhr a spol. Biochem. Biophys.

Res. Comm. 98, 930 (1981)). Nejvýš tři nebo čtyři frakce mající erythropoietinovou aktivitu byly rozlišeny IEF v těchto studiích a žádná nebyla charakterizována s ohledem na obsah cukrů. Dále nebyl stanoven žádný vztah mezi isoelektrickými body frakcí a jejich biologickou aktivitou.

V průběhu purifikace urinárního erythropoietinu z lidské moče, popisované v práci Miyakeho a spol. supra, byly zjištěny dvě erythropoietinové frakce z chromatografie na hydroxylapatitu označené jako II a IIIA, mající stejnou specifickou aktivitu. Následující analýza cukrů frakce II a IIIA prokázala, že frakce II má větší průměrný obsah sialové kyseliny než frakce IIIA (Dordai a spol. supra).

Podstatu předloženého vynálezu je poskytnout separované a izolované isoformy erythropoietinu, mající definovaný obsah sialových kyselin a biologickou aktivitu. Farmaceutické přípravky, obsahující takové molekuly by mohly být terapeuticky prospěšné.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká erythropoietinových isoform. Také poskytuje způsob přípravy erythropoietinové isoformy, obsahující stupněpodrobení čištěného erythropoietinu preparativní isoelektrické fokusací a eluce jednotlivých isoform z gelu. Jsou také poskytovány farmaceutické přípravky, obsahující erythropoietinové isoformy. Předmět vynálezu se také týká způsobů zvýšení hladiny hematokritů u savců, zahrnujících podání terapeuticky přijatelného množství těchto přípravků pro zvýšení produkce retikulocytů a červených krvinek.

Předložený vynález se týká způsobu přípravy směsi

erythropoietinových molekul, majících více než nebo alternativně méně než předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu, který zahrnuje zpracování materiálu, obsahujícího erythropoietin iontověměnnou chromatografií. Předmětem vynálezu je také způsob přípravy směsi erythropoietinových molekul, majících počet sialových kyselin na molekulu větší nebo alternativně menší než je předeterminovaný počet, zahrnující zpracování materiálu obsahujícího erythropoietin chromatofokusací.

Vynález také zahrnuje analogy lidského erythropoietinu, mající větší počet míst pro připojení karbohydrátového řetězce než má lidský erythropoietin, jako je /Asn⁶⁹/EPO, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO, /Thr¹²⁵/EPO, a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO.

Popis připojených obrázků:

Obr.1 představuje analytický isoelektrickofokusační gel z dělení rekombinantních erythropoietinových isoform. Celové dráhy 1-11 představují isoformy rozmezí od méně kyselých (vyšší pI) ve dráze I k kyslejší (nižší pI) ve dráze 11. Čištěný rekombinantní erythropoietin obsahující směs isoform 9- je také uveden v poslední levé a pravé dráze gelu.

Obr.2 představuje vztah mezi počtem sialových kyselin na erythropoietinovou isoformu a specifickou aktivitu in vivo každé isoformy, vyjádřenou jako jednotky na mg erythropoietinového polypeptidu. Na obr. 2A, byla koncentrace každé erythropoietinové isoformy stanovena Bradfordovou proteinovou zkouškou, obr. 2B, byla koncentrace stanovena absorbcí při 280 nm, na obr.2C, byla koncentrace stanovena pomocí RIA.

Obr.3 představuje analytický isoelektrofokusační gel defini-
novaných směsí rekombinantních erythropoietinových
isoforem připravených aniontovýměnnou chromatografií
za různých podmínek. Gelové dráhy 1-6 představují
erythropoietinové isoformy eluované při vysokosolném
promývání po promývání Q-Sepharosové kolony 150 mM ky-
selinou octovou, pH 4,7, 150 mM kyselinou octovou
(nepufrovaná), 200 mM kyselinou octovou, pH 4,7,
250 mM kyselinou octovou, pH 4,7, 300 mM kyselinou
octovou, pH 4,7 nebo 300 mM kyselinou octovou (ne-
pufrovanou). Čištěný rekombinantní erythropoietin,
obsahující směs isoforem získaný za použití postupů
popsaných v příkladu 2 práce Laie a spol. supra, s
tím rozdílem, že DEAE-agarosová chromatografie je
nahrazena chromatografií na Q-Sepharose, je zná-
mě zorně ve dráze zcca a vlevo na gelu.

Obr.4 představuje separaci erythropoietinových isoforem 8
až 12 získaných zpracováním media buněk na sloupci Q-
Sepharose gradientem klesajícího pH a zvažující se
iontové síly. Frakce z frakcí označených 2 až 40 byly
podrobeny analytické isoelektrické fokusaci. Čištěný
rekombinantní erythropoietin obsahující směs isofo-
rem, získaných za použití postupů popsanych v pří-
kladu 2 práce Laie a spol. supra, s tím rozdílem, že
DEAE-agarosová chromatografie byla nahrazena chroma-
tografií na Q-Sepharose, je uveden v poslední levé
dráze tohoto gelu.

Obr.5 představuje aminokyselinovou sekvenci lidského erythro-
poietinu. Čtverečky označují asparaginové zbytky, ke
kterým jsou připojeny/threoninové a serinové zbytky
karboxylátové řetězce a hvězdičky označují

modifikované karbohydrátem. Další glykosylační místa poskytnutá v analogích z příkladu 6 jsou indikována mutacemi asparaginu, serinu a threoninu.

Obr. 6A, 6B a 6C představují serie stupňů klonování při generování plasmidů pro konstrukci a analýzu analogů lidského erythropoietinu. Tyto analogy mají aminokyseliny změněné jak je uvedeno na obr. 5, které poskytují další glykosylační místa.

Obr.7 představuje analýzy Western blot COS buněčných supernatantů sekvencí lidského erythropoietinu a indikovaných erythropoietinových analogů. Analogy /Asn⁹, Ser¹¹/EPO, /Asn⁶⁹/EPO, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO jsou konstruovány jak je popsáno v příkladu 6. Analogy /Pro¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO, /Asn¹²⁶, Ser¹²⁸/EPO a /Thr¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO, které neobsahují další karbohydrátové řetězce jsou zde uvedeny pro srovnání.

Obr.8 představuje Western blot analýzu COS buněčných supernatantů sekvencí lidského erythropoietinu a indikovaných erythropoietinových analogů po zpracování s N-glykanasou. Analogy /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO jsou konstruovány jak je popsáno v příkladu 6. Analogy /Val¹²⁶/EPO, /Pro¹²⁴/EPO, /Pro¹²⁵/EPO, /Thr¹²⁷/EPO, /Pro¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO a /Thr¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO jsou uvedeny pro srovnání.

Obr.9 představuje isoelektrifokusační gel poolů 2,3 a 4 získaných chromatografií na Q-Sepharose a C4 reverzní fází zpracování buněčného média, které podporuje růst CHO buněk transfektovaných erythropoietinovou cDNA, obsahující /Thr¹²⁵/mutaci. Čištěný rekombinantní eryth-

ropoietin, obsahující směs isoform je získán za použití postupů, popsaných v příkladu 2 práce Laie a spol., supra, s tím rozdílem, že DEAE-agarosová chromatografie je nahrazena chromatografií na Q-Sepharose, tyto erythropoietiny jsou uvedeny v levých a pravých drahách gelu.

Podle předloženého vynálezu jsou poskytovány isoformy erythropoietinu. Isoelektrické fokusace (IEF) dělí proteiny na základě náboje. Při umístění do gradientu pH a působením elektrického pole budou proteiny migrovat k bodu, ve kterém nemají náboj sítě a zůstávají na tomto místě. Toto je isoelektrický bod (pI) proteinu. Každý je notlivý pruh pozorovaný při IEF představuje molekuly mající určitý pI a tím tedy obecně i stejný náboj a jsou nazvány jako isoformy. Použitý výraz "erythropoietinové isoforma" označuje erythropoietinové přípravky, mající jevlné pI a mající stejné aminokyselinové sekvence.

Ve výhodném provedení je erythropoietin produkt exprese exogenní DNA sekvence, která byla transfektována do jiných eukaryotních hostitelských buněk než lidských, to jest, ve výhodném provedení je erythropoietin "rekombinantní erythropoietin". Rekombinantní erythropoietin je výhodně produkován postupem popsaným Linem, US patent č. 4703008, uvedeným zde pro úplnost. Rekombinantní erythropoietin je výhodně čištěn podle obecných postupů popsaných v příkladu 2 v US patentu č. 4667016 Laie a spol., který je zde uveden jako odkaz nebo alternativně postupem popsaným v příkladu 2, kde chromatografie na DEAE agarose je nahrazena chromatografií na Q-Sepharose. V modifikaci se sloupcem Q-Sepharosa se 55 mM NaCl nahradí 25 mM NaCl v pufovaném roztoku pro uvedení kolony na neutrální pH a 140 mM NaCl se nahradí 75 mM NaCl v pufovaném roztoku pro eluci erythropoietinu z kolony. Tento materiál při analýze elektroforézou na polyakrylamid-

dovanu gelu s dodecylsulfátem sodným, migruje jako jediný druh (tj. pruh). Jestliže se čištěný erythropoietin podrobí IEF, jsou v gelu zřejmé násobné pruhy, které indikují, že jsou přítomny různě nabitě formy glykoproteinu.

Bylo nalezeno, že jednotlivé isoformy rekombinantního erythropoietinu, mající aminokyselinovou sekvenci z moče získaného lidského erythropoietinu odpovídají erythropoietinovým molekulám, majícím od 1 do 14 sialových kyselin a každá isoforma přítomná v čištěném rekombinantním erythropoietinu má in vivo aktivitu, která má vztah k počtu sialových kyselin isoformy. Výraz "erythropoietin", jak je zde použit, zahrnuje přirozeně získaný erythropoietin, z moče získaný lidský erythropoietin jakož i nepřirozeně se vyskytující polypeptidy, mající aminokyselinovou sekvenci a glykosylaci dostatečně duplikativní s přirozeně se vyskytujícím erythropoietinem pro získání in vivo biologických vlastností takových, že buňky kostní dřeně zvyšují produkci retikulocytů a červených krvinek.

Surové přípravky erythropoietinu mají mnoho isoform, ale materiál čištěný například Laien a spol. supra příklad 2, obsahuje převážně šest isoform při analýze IEF. Dále byla detegována nejméně jedna další isoforma vyšší kyselosti při použití chromatografických postupů popsaných v příkladu 4. (Tato více kyselá forma, migrující při >14 sialových kyselinách na IEF gelu může obsahovat negativní náboje nesialové kyseliny jak je zřejmé z odolnosti vůči štěpení sialidasou). Tyto isoformy se od sebe liší obsahem sialové kyseliny. Jak je uvedeno v příkladech, je toto doloženo izolací 10 takových isoform při preparativní IEF a stanovením obsahu sialové kyseliny u pěti z nich. Z isoform zkoušených na obsah sialové kyseliny bylo zjištěno, že pět isoform obsahuje buď 9, 10, 11, 12 nebo 13 zbytků sialové kyseliny.

Existuje vztah mezi relativní in vivo specifickou aktivitou erythropoietinu a počtem zbytků sialové kyseliny na molekulu erythropoietinu od isoformy 5 do 11 (každá isoforma je zde označena počtem sialových kyselin na molekulu erythropoietinu). Isoformy 11 až 14 mají přibližně stejnou in vivo specifickou aktivitu. Isoformy 5 - 14 byly studovány pokud jde o jejich in vivo aktivitu exhypoxickou polycythemickou biozkouškou na myších a množství každé přítomné isoformy je stanoveno Bradfordovou proteinovou zkouškou, absorbance při 280 nm nebo radioimuno zkouškou (RIA) erythropoietinu. RIA stanovení (Grieg a spol. Immunobiology 172, 213 (1986)), vyjádřené jako jednotky/ml jsou rozděleny mezi 212,770 jednotkami/mg erythropoietinového polypeptidu, průměrné specifické aktivity čistěného erythropoietinu stanovené pomocí HLA ušívají proteinové koncentrace izolovaných isoform nebo směsí isoform, vyjádřené jako mg erythropoietinového polypeptidu/ml. Tak je uvedeno v příkladech, relativní in vivo aktivita se postupně zvyšuje od isoformy 5 do isoformy 11 (viz tabulka 2).

In vivo specifické aktivity, které jsou zde uvedeny, jsou měření relativních in vivo specifických aktivit a nejděná se o absolutní in vivo specifické aktivity. Pro účely této přílohy jsou specifické aktivity použity pouze pro srovnání relativních aktivit isoform, studiem za stejných podmínek ve stejných pokusech, zahrnujících stejné vnitřní standardy, stejný typ zvířat, mající stejné analytické údaje použité pro výpočet specifické aktivity, stejnou zkoušku pro stanovení obsahu proteinu. Nemí předpokládáno, že jakákoliv hodnota in vivo specifické aktivity uvedená pro jakoukoliv isoformu představuje základní nebo absolutní hodnotu pro tuto isoformu.

Předložený vynález poskytuje erythropoietinové isoformy. Specifické isoformy erythropoietinu, získané v souladu

s předloženým vynálezem a jejich vlastnosti se mohou měnit v závislosti na zdroji výchozího materiálu. Například isoformy z moče získaného lidského erythropoietinu jsou odlišné od isoform rekombinantního erythropoietinu. Ve výhodném provedení se vynález týká erythropoietinové isoformy mající specifický počet (např. pevný počet vyšší než 0) sialových kyselin na molekulu erythropoietinu, uvedený počet je zvolen ze skupiny zahrnující 1 až 14. Výhodný je počet 9, 10, 11, 12, 13 nebo 14. V dalším provedení je počet vyšší než 14, výhodně 16 až 23.

Tento vynález také poskytuje přípravky, obsahující dvě nebo více erythropoietinových isoform. V jednom provedení kompozice zahrnují směs isoform, majících více než předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu erythropoietinu, např. vyšší 11 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu nebo vyšší než 12 sialových kyselin na molekulu, např. směs isoform 12, 13 a 14. V dalším provedení kompozice obsahují směsi isoform, mající předeterminovaný počet sialových kyselin na erythropoietinovou molekulu, např. méně než 12, ale více než 8 sialových kyselin na molekulu jako je např. směs isoform 9, 10 a 11. Vynález také poskytuje přípravky obsahující erythropoietinové isoformy, kde jsou relativní množství isoform stejná nebo rozdílná. Například směsi isoform 9, 10 a 11 by mohly mít isoformy v různých poměrech jako je 1:1:1, 2:3:1 nebo 20:20:1.

Výhodně přípravky obsahují směsi méně než čtyř isoform, například směs isoform 11, 12 a 13, nebo směs 12 a 14, nebo směs 7 a 13.

Pro přípravu směsí erythropoietinových isoform vynález také poskytuje způsoby současné izolace vybraných erythropoietinových isoform. Tyto postupy zahrnují izolaci indi-

viduálních isoforem takovými technikami jako je isoelektrická fokusace nebo příprava směsí isoforem, majících předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu (například vyšší než 11) takovými technikami jako je iontovýměnná chromatografie nebo chromatofokusace. Všechny tyto techniky jsou založeny na separaci proteinů podle náboje.

Obecně, iontovýměnná chromatografie a chromatofokusace zahrnují aplikaci buď surového lidského erythropoietinu (buněčné kondicionované medium) nebo čištěného materiálu na sloupec pryskyřice za podmínek, kdy dochází k vázání některých nebo všech erythropoietinových isoforem na pryskyřici. U surových erythropoietinových přípravků je výhodné aplikovat protein na sloupec při asi pH 7, zatímco pro čištěné přípravky může být protein aplikován na kolonu při pH 7 až asi pH 4. Po promytí sloupce pufrům při asi pH 4 se ty erythropoietinové isoformy, které zůstaly vázány na sloupci ioncku eluují při zvyšujícím se pH a koncentraci soli pufru nebo aplikací gradientu snižujícího se pH a zvyšující se iontové síly při pH asi 4. Při chromatofokusaci jsou isoformy eluovány ze sloupce gradientem snižujícího se pH nebo promýváním sloupce vysokou koncentrací soli.

Jedno provedení vynálezu se týká savčích (např. z ovarya čínské křečka, CHO) hostitelemých buněk, které přednostně syntetizují erythropoietinové isoformy, mající více než specifický počet, např. více než 10 sialových kyselin na molekulu. Erythropoietinové molekuly mají N-vázané nebo O-vázané oligosacharidové struktury, které mohou limitovat obsah sialové kyseliny v molekule. Například, tetraantennární (čtyř-rozvětvené) N-vázané oligosacharidy nejobvykleji poskytují čtyři možná místa pro připojení sialové kyseliny, zatímco bi- a triantennární oligosacharidové řetězce, které mohou nahradit tetraantennární formu na asparaginových při-

pojovacích místech, mohou obvykle připojovat nejvýše dvě nebo tři sialové kyseliny. O-Vázané oligosacharidy obvykle poskytují dvě místa pro připojení sialové kyseliny. Erythropoietinové molekuly tak mohou akomodovat celkem 14 zbytků sialové kyseliny s tím, že všechny tři N-vázané oligosacharidy jsou tetraantennární. Kultury savčích buněk jsou prohledávány na ty buňky, které mají přednostně připojeny tetraantennární řetězce k rekombinantnímu erythropoietinu, a tedy maximalizovaný počet míst pro připojení sialové kyseliny.

N-vázané oligosacharidy erythropoietinu z moče obsahují sialovou kyselinu na obou spojeních α 2,3 a α 2,6 ke galaktoze (Takeuchi a spol., J.Biol.Chem. 263, 3657 (1988)). Typicky je sialová kyselina v α 2,3 spojení připojena ke galaktoze α 1,6 rozvětvení mannozy a sialová kyselina ve α 2,6 spojení je připojena ke galaktoze α 1,3 rozvětvením mannozy. Enzymy, které připojují tyto sialové kyseliny (β -galaktosidáza α 2,3 sialyltransferáza a β -galaktosid α 2,6 sialyltransferáza) jsou nejučinnější při připojování sialové kyseliny k manoze α 1,6 a mannoze α 1,3 větvení.

Dihydrofolát reduktáza (DHFR) postrádající buňky ovarya čínské křečka (CHO) se obvykle používají jako hostitelské buňky pro produkci rekombinantních glykoproteinů včetně rekombinantního erythropoietinu. Tyto buňky neexprimují enzym β -galaktosidáza α 2,6-sialyltransferázu a proto nepřidávají sialovou kyselinu k α 2,6 spojení N-vázaného oligosacharidu glykoproteinů produkovaných v těchto buňkách. (Mutsaers a spol. Eur.J.Biochem. 156, 691 (1986); Takeuchi a spol. J.Chromatogr. 400, 207 (1987)). Následkem toho rekombinantní erythropoietid produkovaný CHO buňkami postrádá sialovou kyselinu na spojeních 2,6 ke galaktoze (Sasaki a spol., (1987), supra; Takeuchi a spol., (1987), supra). V dalším

provedení vynálezu je erythropoietin použit pro produkci isoformem připravován v CHO buňkách, které jsou transfektovány funkčním β -galaktosid α 2,6-sialyltransferázovým genem pro získání inkorporace sialové kyseliny do α 2,6 vazby ke galaktoze. Viz Lee a spol. J.Biol.Chem. 264, 13848 (1989), práce je zde uvedena jako odkaz pro popis technik pro získání modifikovaných CHO buněk nebo jiných savčích hostitelských buněk.

Do vynálezu jsou rovněž zahrnuty některé analogy lidského erythropoietinu. Použitý výraz "analog lidského erythropoietinu" představuje erythropoietin s jedním nebo více náboji v aminokyselinové sekvenci lidského erythropoietinu, což vede ke zvýšení počtu míst pro připojení sialové kyseliny. Analogy jsou poskytovány místy řízenou mutagenezí, zahrnující adice, delece nebo substituce aminokyselinových zbytků, což přeměňuje místa tak, že jsou dostupná pro glykosylaci. Takové analogy mají větší počet karbohydrátových řetězců než lidský erythropoietin.

Ještě analogy mající zvýšenou biologickou aktivitu jsou konstruovány zvyšováním obsahu sialové kyseliny v molekule erythropoietinu. Analogy mající obsah sialové kyseliny vyšší než bylo nalezeno u lidského erythropoietinu jsou připravovány přidáváním glykosylačních míst, která nebudou poškozovat sekundární nebo terciární konformaci potřebnou pro biologickou aktivitu. Výhodně analog lidského erythropoietinu má 1, 2 nebo 3 přidavné místa pro N-glykosylaci nebo O-glykosylaci. Například leucin v poloze 69 je nahrazen asparaginem za vzniku sekvence Asn-Leu-Ser, která slouží jako čtvrté místo pro N-glykosylaci. Taková změna může obvykle poskytnout až čtyři další sialové kyseliny na molekulu. Příklady dalších změn, které generují další N- nebo O-glykosylační místa jsou eliminace v polohách 105 a 127 na asparagin

a serin, alanin v poloze 125 na threonin a alaniny v polohách 124 a 125 na prolin a threonin. Pro odborníky bude zřejmé, že předložený vynález zahrnuje mnohé další analogy lidského erythropoietinu, mající další místa pro glykosylaci.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají farmaceutické přípravky obsahující terapeuticky účinné množství specifické isoformy nebo směs isoform společně se vhodným ředidlem, přísadou a/nebo nosičem vhodným při terapii erythropoietinu. Výraz "terapeuticky účinné množství", který je zde použit, zahrnuje množství, které vyvolává terapeutické účinek při daných podmínkách a režimu podání. Podání erythropoietinových isoform se výhodně provádí parenterálním způsobem. Specifický způsob bude záviset na podmínkách, které jsou ošetřovány. Podání erythropoietinových isoform je výhodně provedeno v části přípravku, který obsahuje vhodný nosič jako je lidský serový albumin, vhodné ředidlo jako je pufovaný salinický roztok a/nebo vhodná přísada. Potřebná dávka bude taková, že její množství dostačuje ke zvýšení hematokritu pacienta a bude záviset na obtížnosti podmínek, které mají být ošetřovány, způsobu podání a podobně.

Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu, ale nikterak jej neomezují. Erythropoietinový standard použitý v in vivo biostudiích v příkladech je rekombinantní erythropoietinový standard, který byl standardizován vůči částečně čištěnému erythropoietinovému standardu z moče. Takto jsou měřeny pouze relativní in vivo specifické aktivity. In vivo specifické aktivity jsou vyjádřeny v "jednotkách/ml", "jednotkách/mg" a "jednotkách/A₂₈₀" a ne jako "IU/ml", "IU/mg" a "IU/A₂₈₀", protože použitý erythropoietinový standard není přímo korelovan k mezinárodnímu existujícímu standardu.

Příklady provedení

Příklad 1

Izolace isoform rekombinantního erythropoietinu

Rekombinantní erythropoietin je produkován jak je popsáno dříve, supra. Rekombinantní erythropoietin použitý jako výchozí materiál pro izolaci první a třetí isoformy je čištěn podle postupu popsaného v příkladu 2 práce Laie a spol., supra. Výchozí materiál pro izolaci druhé a páté isoformy je čištěn podle Laie a spol., supra za použití modifikace Q-Sepharosové chromatografie. Tyto přípravky obsahují směs isoform rekombinantního erythropoietinu majících stejné aminokyselinové sekvence jako lidský erythropoietin získaný z lidské moče a obsahují převážně isoformy 9 až 14. Výchozí materiál pro přípravu čtvrté isoformy je materiál, který je eluován během 5 mM kyselina octová/1 mM glycin/6M močovinného promývání aniontovýmenné kolony v příkladu 2 práce Laie a spol. Tato frakce obsahuje isoformy s méně než nebo obsahující 9 sialových kyselin a byla dále čištěna gelovou filtrační chromatografií jak je popsáno v příkladu 2 práce Laie a spol. před použitím v preparativním isoelektrickém fokusačním postupu. Příprava šesté isoformy používá jako výchozí materiál čištěný přípravek rekombinantního erythropoietinu mající od 4 do 13 sialových zbytků. Tento materiál byl čištěn jak je popsáno v příkladu 2 Laie a spol. s výjimkou pro modifikaci iontovýmenné kolony (eluze rekombinantního erythropoietinu gradientem chloridu sodného při pH 8,4 a vypuštění promývání kyselinou octovou/močovinou), která vede k retenci nejvíce isoform, přítomných ve výchozím materiálu.

Šest různých přípravků individuálních isoform bylo zpracováno preparativní isoelektrickou fokusací na granulozaném gelu (Ultradex, LKB) v podstatě jako LKB Application Note 198. Pharmalyte (Pharmacia) 2,5-5 amfolity (Phar-

macia) jsou používány a gelové lože obsahuje 5 M močoviny.

V první přípravě se na gel aplikuje přibližně 20 mg rekombinantního erythropoietinu v 6,8 ml 20 mM citrátu sodném/100 mM chloridu sodném, pH 7,0 a zpracovává fokusací při 8 wattech po přibližně 16 hodin. Po isoelektrické fokusaci se proužky isoforem v gelu vizualizují přitisknutím papíru ke gelovému loži. Vyrobí se otisk a pak se fixuje namočením ve třech provedeních (přibližně 10 minut, teplota místnosti) do fixačního roztoku (40% methanol/10% kyselina octová/10% TCA/3,5% sulfosalicylová kyselina), podrobí další změně (asi 10 minut) - 40% methanol/10% kyselina octová (30 až 60 °C), barví se 15 minut při 60 °C v 0,125% Coomassie Blue R-250/40% methanol/10% kyselina octová a pak se odbarví v 7,5% methanolu/10% kyselině octové pro vizualizaci oddělených isoforem. Vlast granulovaného gelového lože, obsahující isoformy (\approx 50 % pryskyřice) se odebere, přidá se voda (\approx 16 ml) a kaše se nalije na misku 5,5 x 24,5 " a odpaří na asi 40 g čisté hmotnosti. Tento přípravek se zpracuje fokusací podruhé a otisk gelového lože se připraví jak bylo výše uvedeno. Část gelu, obsahující každou ze šesti rozlišitelných isoforem se odebere z gelového lože.

Za účelem eluce isoforem z gelu, se přidá ke každé isoformě roztok, obsahující 10 mM Tris-HCl, pH 7,0/ 5 mM Chaps pro přípravu kaše. Kaše se umístí do malých kolon a promyje Tris-Chaps pufrem. Výtok kolonou byl odebrán a aplikován odděleně na malé kolony (otevřené uspořádání kolony), obsahující Vydac C4 pryskyřici s reverzní fází ekvilibrovanou ve 20% ethylonu/10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Kolony se postupně vyvíjejí 20% ethanolem/10 mM Tris-HCl, pH 7,0, 35% ethanolem/10 mM Tris-HCl, pH 7,0, a 65% ethanolem/10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Frakce eluované 65% ethanolem/10 mM Tris se zředí 1:1 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 a zahustí a pak se pufr nahradí 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 za použití Centricon-10 (Amicon) mikrokonzentrátoru. Analytická isoelektrická foku

sace tohoto přípravku se provede v podstatě jak je popsáno v LKB technická poznámka 250 za použití Servalyte 3-5 ampholinů (Serva) v polyakrylamidovém gelu, obsahujícím 5 M močoviny.

Ve druhé přípravě se na gel aplikuje asi 26 mg rekombinantního erythropoietinu v 6,5 ml deionizované vody a fokusuje se při 2,5 Wattedch po 35 minut a 10 Wattedch asi 17 hodin. Proužky fokusovaného proteinu, které jsou viditelné v gelovém loži se odeberou jako 11 různých skupin. Každá skupina se převede do asi 7,5 ml deionizované vody a 20 ml každého z výsledných supernatantů z těchto skupin se podrobí analytické isoelektrické fokusaci jak je popsáno výše. Ke každé ze skupin se přidá 5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 a kaše se umístí každá do malé kolony a ponechá se vytéci kapalná fáze. Fryskařice se promyje přibližně třemi objemy 0,5 M Tris-HCl, pH 7 a promývací roztok se spojí s proteklou kapalinou. Eluované roztoky se zahustí a pufr se vymění za 20 mM citrátu sodného/100 mM chloridu sodného, pH 7,0 za použití Amicon ultrafiltračního zařízení majícího průnik 10000 daltonů mol.hmotnosti. Koncentrované roztoky (asi 0,5 ml) pak procházejí 0,22 mikrometrovým filtrem z acetátu celulozy. Vzhledem k analytické isoelektrické fokusaci bylo nalezeno pět skupin, obsahujících převážně jednotlivé isoformy 10, 11, 12, 13 a 14.

Ve třetí přípravě se na gel aplikuje asi 30 mg rekombinantního erythropoietinu ve 21,8 ml destilované vody a fokusuje se při 2 Wattedch po 25 minut, při 10 Wattedch po 20 hodin a 15 Wattedch 15 minut. Proužky proteinu, odpovídající individuálním isoformám jsou pozorovány vizuálně a odebrány z gelového lože. K isoformám izolovaným z gelu se přidá destilovaná voda, připraví se kaše a vzniklé supernatanty se analyzují analytickou isoelektrickou fokusací. Ke každé kaši se přidá stejný objem 1 M Tris-HCl, pH 7,2., sus-

senze se umístí do oddělených malých kolon a kapalná fáze se nechá vytéci z kolony pro eluci isoforem. Každý výtok se zahustí a pufr se vymění za 20 mM sodný citrát/100 mM chlorid sodný, pH 7,0 za použití Amicon zařízení pro ultrafiltraci s dělením 10000 dalton mol. hmotnosti. Analytický isoelektrofokusační gel informuje o tom, že byly získány skupiny, obsahující zejména jednotlivé isoformy 9, 10, 11, 12, 13 a 14.

Čtvrtá příprava isoformy používá jako výchozí materiál erythropoietin, obsahující isoformy 3 - 9 (připravené výše). Před preparativní isoelektrickou fokusací provedenou v podstatě jak bylo popsáno výše pro přípravu 1 až 3, byly ampholyty (Pharmalyte 2,5-5) prefrakcionovány v Rotofor (Bio-Rad, Richmond, CA) buňce pro isoelektrickou fokusaci s kapalnou fází, pro získání ampholytů vhodnějších pro nižší isoelektrické body výchozího materiálu. Prefrakcionace se provádí smísením 6,7 ml Pharmalytu 2,5-5 s 15 g močoviny a přidáním vody na objem 50 ml. Směs se frakcionuje v Rotoforu při 10 wattch, 1°C po 5 1/2 hodiny za použití 0,1M kyseliny fosforečné a 0,1 M hydroxidu sodného jako anolytu a katolytu. Ampholytové frakce, mající zjištěné pH mezi 4,5 a asi 6 byly použity pro isoelektrickou fokusaci plochého lože.

Amfolyty byly získány z isoforem za použití Centrielluturu (Amicon, Danvers, MA) a 10000 MW Centriconu (Amicon) za použití následujících parametrů: 0,18 Tris pufr 8,8, 100 Volt, 25-30 mA, po 3 hodiny. Isoformy byly pak pufrém převedeny do 0,1 M chloridu sodného gelovou filtrací za použití Sephadexu G-25 (Pharmacia). Analytická isoelektrická fokusace pěti výsledných poolů prokázala, že obsahují isoformy 4,5,6,7 a 8. Isoforma 4 vykazuje několik proužků což indikuje, že prošla určitou degradací.

Příprava páté isoformy byla modifikována přidavkem prefokusačního stupně k postupu isoelektrické fokusace na plochém loži. V této modifikaci nebyl přidán protein ke směsi amfolyt/močovina/gel před elektroforézou, ale byl přidán do isoelektrického fokusačního zařízení s následujícím vývojem gradientu pH v gelovém loži. Po prefokusaci po 75 minut (1500 volt/h) byly sekce gelového lože ve vzdálenosti 2,25 -4,25 cm od katody odebrány, smíseny s roztokem erythropoietinu a přidány zpět ke gelovému loži. Po isoelektrické fokusaci byly isoformy 10, 11, 12, 13 a 14 eluovány z gelového lože a odděleny od amfolytů ultrafiltrací za použití zařízení Centricon-10 (Amicon).

Prefokusační modifikace byly uskutečněny pro to, aby charakteristiky ultrafialové absorbance přípravků, obsahujícím isoformy byly podobnější těmto charakteristikám výchozího rekombinantního erythropoietinu. Zlepšení ve spektrálních charakteristikách může být zřejmé z poměru absorbance při 280 a 260 nm u izolovaných isoformem. Průměrný poměr absorbance při 280 nm k absorbanci při 260 nm (A_{280}/A_{260}) pro isoformy z přípravků 2 a 3 (ne-prefokusované) je $1,36 \pm 0,11$, zatímco průměrný poměr A_{280}/A_{260} pro přípravky 5 a 6 (pre-fokusované) je $1,68 \pm 0,20$. Jestliže je isoforma č. 14 vyloučena z propočtů, průměrné A_{280}/A_{260} poměry jsou $1,39 \pm 0,11$ a $1,74 \pm 0,09$ pro přípravky 2 a 3 a 5 a 6. (Isoforma 14 může mít nejatypičtější spektrum, protože je přítomna v nejmenších množstvích a je tak navíc náchylná k interferencím stopovou kontaminací amfolytovými komponentami nebo protože je nejbližší elektrodě během provádění isoelektrické fokusace na plochém loži.). Průměrný A_{280}/A_{260} poměr pro rekombinantní erythropoietin připravený podle příkladu 2 Laie a spol. (modifikovaný jak bylo popsáno použitím Q-Sepharosy jako aniontovýměnné pryskyřice) je $1,91 \pm 0,04$.

Jak je popsáno výše, výchozí materiál pro přípravu isoformy č.6 byl rekombinantní erythropoietinový přípravek obsahující isoformy 4-13. Amfolyty byly pre-fokusovány v zařízení Rotofor jako ve čtvrté přípravě. Pro isoelektrickou fokusaci na plochem loži byly použity amfolytové frakce, mající pH mezi 3,7 a 4,8. Ploché lože bylo prefokusováno postupem jako v přípravě č. 5 a isoformy 9, 10, 11, 12 a 13 byly získány po ultrafiltraci (Centricon-10) pro odstranění amfolytů.

Příklad 2

Obsah sialové kyseliny v isoformách rekombinantního erythropoietinu

Isoformy izolované jak bylo popsáno v příkladu 1 a erythropoietin čištěný postupy popsányi Laiem a spol., supra (směs isoform 9 až 14) jsou puřem převedeny do 0,10 - 0,15 M chloridu sodného a analyzovány na obsah sialové kyseliny modifikací postupu podle Jourdiana a spol., J.Biol.Chem. 246, 430 (1971). Zbytky sialové kyseliny jsou odštěpeny od glykoproteinů hydrolýzou 0,35 M kyselinou sírovou při 80 °C po 30 minut a roztoky jsou neutralizovány hydroxidem sodným před analýzou. Za účelem vyhodnocení množství přítomného erythropoietinového proteinu se provede stanovení proteinu podle Bradforda (Bradford Anal. Biochem. 72, 248 (1976)) za použití rekombinantního erythropoietinu, majícího aminokyselinovou sekvenci lidského erythropoietinu jako standard za použití zkušebních reagentů a mikrozůsobu podle Bio-Rad. Výsledky, vyjádřené jako moly sialové kyseliny na mol erythropoietinu, jsou uvedeny v tabulce 1. Isoformy jsou označeny podle počtu sialových kyselin na molekulu a rozsahu od málo kyselých (isoforma 9) do nejkyselějších (isoforma 13). Isoformy 9-13 jsou uvedeny v gelových drahách 6-10 obr. 1. Množství isoformy 14 jsou nedostatečná k přesnému měření obsahu sialo-

vé kyseliny. Obsah sialové kyseliny v této isoformě je odhadnut z její migrace na IEF gelech vzhledem k dalším isoformám. Obsah sialové kyseliny isoformem 5-8 (přípravek č.4) nebyl měřen, ale je pravděpodobně odhadnut z jejich migrací na IEF gelech.

Tabulka 1

<u>Isoforma</u>	<u>moly/sialové kyseliny/</u>
<u>erythropoietinu</u>	<u>mol erythropoietinu</u>
isoforma 13	12,9 ± 0,5
isoforma 12	11,8 ± 0,2
isoforma 11	11,0 ± 0,2
isoforma 10	9,8 ± 0,3
isoforma 9	8,9 ± 0,6
směs isoformem (9-14)	11,3 ± 0,2

Příklad 3

Aktivita isoformem rekombinantního erythropoietinu

Isoformy izolované jak bylo popsáno v příkladu 1 byly hodnoceny podle absorbance při 280 nm, Bradfordovou proteinovou zkouškou a pomocí RIA pro erythropoietin pro stanovení množství přítomného rekombinantního erythropoietinu. Exhypoxická polycythemická biostudie na myších (Cotes a spol., Nature 191, 1065 (1961) se použije pro stanovení in vivo biologické aktivity. Kvantifikace množství erythropoietinového proteinu přítomného podle radioimuno-zkoušky pro erythropoietin poskytuje výsledky mající vyšší relativní in vivo specifickou aktivitu pro některé isoformy, protože zjevně snížená imunoreaktivita isoformem, obsahujících velké množství sialové kyseliny vede k podhodnocení koncentrace erythropoietinu a tak k nadhodnocení in vivo specifické aktivity pro nejvíce negativní isoformy. Stanovení z biostudie na myších, vyjádřená jako jednotky/ml, jsou

jsou děleny koncentracemi odpovídajících proteinů pro získání in vivo specifických aktivit vyjádřených jako jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu. Tyto specifické aktivity jsou uvedeny v tabulce 2.

V tabulce 2, je "n" počet nezávislých přípravků isoformem, které spolupůsobí hodnotu specifické aktivity. V nejvíce případech byly provedeny in vivo studie pro každý přípravek isoformy. Některé in vivo údaje pomáhají při výpočtech specifické aktivity ve všech třech sloupcích, jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu byly stanoveny z absorbance při 280 nm, z hodnot radioimuno zkoušky nebo z výsledků Bradfordovy proteinové zkoušky. Čištěný rekombinantní erythropoietin, obsahující isoformy 9-14 byl použit jako standard v Bradfordově proteinové zkoušce. "n" může být menší pro výpočty provedené za použití Bradfordovy proteinové zkoušky, protože některé přípravky nebyly v době provádění Bradfordovy zkoušky dostupné.

Erythropoietin čištěný podle postupů popsaných Laiem a spol., supra a obsahující směs isoformem 9 až 14 byl použit jako standard ve zkouškách RIA a in vivo.

Relativní specifické aktivity vyjádřené jako jednotky / mg erythropoietinového polypeptidu mohou být převedena na jednotky/ A_{280} násobením 0,807 mg erythropoietinového polypeptidu/ A_{280} . Přepočítávací faktor je získán násobením extinkčního koeficientu erythropoietinu (1,345 mg/ A_{280}) obsahem proteinu v erythropoietinovém glykoproteinu (asi 60 % hmotnostních, Davis a spol., Biochemistry 26, 2633 (1987)) pro vyjádření mg erythropoietinového polypeptidu/ A_{280} (tj. 1,345 mg erythropoietinu/ A_{280} x 0,60 mg polypeptidu/mg erythropoietinu = 0,807 mg polypeptidu/ A_{280}). Dále specific-

ké aktivity vyjádřené jako jednotky/mg erythropoietinového polypeptidu mohou být násobeny faktorem 0,60 mg polypeptidu/mg erythropoietinového glykoproteinu pro získání specifických aktivit vyjádřených jako jednotky/mg erythropoietinového glykoproteinu.

Tabulka 2

Isoforma	U/mg polypeptidu (Bradfordova pro- teinová zkouška)	n	U/mg polypeptidu (z A230)	n	U/mg polypeptidu (z RIA)	n
14	289,400 ± 3,100	2	209,800 ± 37,700	2	366,700 ± 55,900	2
13	307,600 ± 30,600	4	258,700 ± 59,500	5	337,200 ± 43,200	5
12	275,200 ± 55,600	4	258,400 ± 41,700	5	287,700 ± 42,600	5
11	282,700 ± 41,100	3	255,800 ± 57,300	4	251,400 ± 62,700	4
10	188,000 ± 1,900	1	170,300 ± 24,500	3	171,300 ± 31,600	3
9	50,000 ± 1,000	1	96,600 ± 46,700	2	113,600 ± 39,600	2
8	69,200 ± 3,800	1	79,600 ± 4,100	1	61,000 ± 3,500	1
7	46,200 ± 5,800	1	50,300 ± 6,300	1	42,800 ± 5,400	1
5	16,600 ± 1,700	1	18,300 ± 1,900	1	15,500 ± 1,600	1

Údaje z tabulky 2 jsou také znázorněny na obr. 2A, 2B a 2C. Tyto údaje ukazují, že relativní in vivo aktivita erythropoietinu se zvyšuje jako funkce obsahu sialové kyseliny až do isoformy č. 11. Isoformy č. 11-14 mají v podstatě stejnou relativní in vivo bioaktivitu. (Toto je nejzjevnější, jestliže je koncentrace isoformy 14 vyjádřena použitím hodnoty z Bradfordovy zkoušky. Bradfordova hodnota může být pro isoformu 14 přesnější, protože jsou obecně získány nižší hodnoty a to vede k obtížím při stanovení pomocí A_{280} a nejzřejmějšímu snížení reaktivity v RIA pro velmi negativní formy, jak bylo uvedeno dříve). Vyšší in vivo specifická aktivita erythropoietinových isoform, majících více sialových kyselin je nejpravděpodobněji způsobena delším průběhem poločasu životnosti těchto forem. Isoformy 9 a 13 jsou značeny radioaktivním jodem (^{125}I) a byla stanovena rychlost jejich štěpení u krys. Poločas životnosti v oběhu byl výrazně delší pro isoformu 13 než pro isoformu 9.

Příklad 4

Dělení směsí isoform rekombinantního erythropoietinu chromatografií na Q-Sepharose

Buněčná kondiciovaná média z produkce rekombinantního erythropoietinu podle postupů popsaných Linem, supra, se koncentrují a diafiltrují proti 10 mM Tris, pH 7,2. Koncentrace proteinu se stanoví Bradfordovou mikroproteinovou zkouškou za použití hovězího serového albuminu jako standardu. 19,6 ml roztoku, obsahujícího 40 mg celkového proteinu se připraví ve 20 μM CuSO_4 , filtruje přes 0,45 mikrometrový filtr a vlije na 4ml kolonu (1,05 cm výška x 2,2 cm průměr) plněnou náplní Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia), která byla ekvilibrována 10 mM Tris, pH 6,8 až 7,0 při 4 °C.

Po aplikaci vzorku se kolona promyje dvě objemy kolony pufru. Průtok kolonou je asi 1 ml/min. Pro dělení směsí isoformem erythropoietinu se použije šest oddělených kolon.

Kolony se promyjí 6 až 9 objemy pufru o nízkém pH: kolona č. 1, 150 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO_4 , 6 M močovina, upraveno na pH 4,7 NaOH, kolona č. 2, 200 mM octová kyselina, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO_4 , 6 M močovina, upraveno na pH 4,7 NaOH, kolona č. 3, 250 mM octová kyselina, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO_4 , 6 M močovina upraveno na pH 4,7 NaOH, kolona č. 4, 300 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO_4 , 6 M močovina upraveno na pH 4,7 pomocí NaOH, kolona č. 5, 150 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO_4 , 6 M močovina, kolona č. 6, 300 mM kyselina octová, 1 mM glycin, 20 μ M CuSO_4 , 6 M močovina. pH kolon se zvyšuje na asi pH 7 promýváním každé kolony 8 až 11 objemy kolony 10 mM Tris-HCl, 55 mM NaCl, 20 μ M CuSO_4 , pH 7. Definované erythropoietinové isoformové směsi jsou z kolon eluovány promýváním 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 20 μ M CuSO_4 , pH 7,0.

Eluované isoformové pooly z každé kolony se zahustí a rozpouštědlo se vymění vodou za použití Amico Centricon-10 mikrokonzentrátoru. Výsledky analytické isoelektrické fokusace těchto koncentrovaných poolů jsou uvedeny na obr.3. Gelové dráhy 1-6 představují definované směsi erythropoietinových isoformem eluovaných z kolon 1-6. "Isoformová směs" uvedená v poslední pravé dráze gelu na obr. 3 představuje buněčné medium, které je aplikováno na kolonu Q-Sepharosy jak je popsáno výše, kolona se promyje 5 mM kyseliny octové, 1 mM glycinu, 20 μ M CuSO_4 , 6M močoviny a směs isoformem erythropoietinu se eluuje z kolony za použití výše popsaných postupů. Tato eluovaná směs isoformem se dále čistí podle postupů popsaných v práci Laie a spol., supra, před analytickou isoelektrickou fokusací.

Příklad 5

Frakcionace isoform rekombinantního erythropoietinu za použití nízkého pH gradientu na Q-Sepharose

V dalším postupu jsou isoformy erythropoietinu separovány za použití gradientu snižování pH a zvyšování iontové síly. Koncentrované diafiltrované, erythropoietin obsahující médium se vnese na kolonu Q-Sepharosy v poměru asi 40 mg celkového proteinu/ml gelu. Kolona se pak promyje asi dvěma objemy kolony 10 mM Tris HCl, pH 7,0 a pak asi 10 objemy kolony 2 mM kyseliny octové/1 mM glycinu/20 μ M CuSO_4 /6 M močoviny (pH přibližně 4,8) pro odstranění kontaminujících proteinů a erythropoietinových isoform, obsahujících méně než asi 7 zbytků sialové kyseliny. Isoformy, obsahující od přibližně 8 do přibližně 12 sialových kyselin jsou z kolony eluovány za použití gradientu od počátečního 2, mM kyseliny octové v 6 M močoviny/1 mM glycinu/20 μ M CuSO_4 a do až 40 mM kyseliny octové/6 M močoviny/1 mM glycinu/20 μ M CuSO_4 (pH přibližně 4). Celkový objem gradientu je přibližně 40 objemů kolony a frakce přibližně jednoho objemu kolony se odebírají do nádob, obsahujících objem Tris pufru dostačující k uvedení pH do rozmezí 6 - 8,5 proto, aby se zabránilo dlouhodobému vystavení odebraných frakcí nízkému pH. Podíly frakcí se podrobí analytické isoelektrické fokusaci pro sledování separace. Obr.4 ukazuje separaci isoform 8-11, které může být dosaženo tímto postupem. Isoformy 12 - 14, které zůstávají vázány na koloně při konci gradientu, jsou eluovány promýváním pufrům, obsahujícím 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 20 μ M CuSO_4 (pH 7,0). Isoformy (separované působením gradientu nebo eluované roztokem chloridu sodného) jsou prosté kontaminujících proteinů při chromatografii na reverzní fázi, následované filtrační gelovou chromatografií jak je popsáno v příkladu 2 v práci Laie a spol..

Příklad 6

Analogy lidského erythropoietinu, mající další glykosylační místa

A. Konstrukce analogů lidského erythropoietinu

Umístění existujících a navržených míst pro připojení karbohydrátu v erythropoietinové aminokyselinové sekvenci jsou uvedena na obr. 5 a postup přípravy těchto dalších glykosylačních míst je shrnut na obrázcích 6A-C a je popsán dále.

Za použití in vitro mutagenese byly syntetizovány následující oligonukleotidové primery:

/Asn⁴, Ser⁶/EPO: 5'CGCCCACCAAACCTCAGCTGTGACAGCCGA 3'

/Asn⁹, Ser¹¹/EPO: 5'ATCTGTACAACCGAAGCCTGAGAGGT 3'

/Asn⁶⁹/EPO: 5'GGGCCTGGCCAAACCTCTCGGAAC 3'

/Asn¹²⁴/EPO: 5'TCCCCTCCAGATAAATCCCTCAGCTGC 3'

/Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO: 5'GAGATGCCGAACTCATCTGCTCCAC 3'

/Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵/EPO: 5'AGGCCTGCAGGAATGGGAGCCAGATGACCAGGTTG 3'

/Thr¹²⁵/EPO: 5'TCCAGATGCCGACCTCAGCTGCTC 3'

/Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO: 5'CCTCCAGATCCGACCTCAGCTGC 3'

Podtržené kodony představují nevhodně spojené oblasti, kde aminokyseliny uvedené v závorkách nahrazují divoký typ aminokyselin.

/Asn⁴, Ser⁶/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa u Asn 4. /Asn⁹, Ser¹¹/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa k Asn 9. /Asn⁶⁹/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa k Asn 69. /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO byl konstruován přidáním N-glykosylačního místa k Asn 125. /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO byly konstruovány přidáním O-glykosylačního místa u Thr 125.

Následující oligonukleotidové priméry jsou syntetizovány za použití in vitro mutagenese:

/Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO: 5'GGGCCTGGCCCAACCTGACAGAAGCTGTC 3'

/Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO:

5'CAGGGCCTGTCCCAACCTGACAGAAGCTGTC 3'

/Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO: 5'CAGATGGCGAACTCAACGGCTCCAC 3'

/Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹/EPO:

5'ATGGCGAACTCAACGGCTCCACTCACAACAATCACT 3'

/Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO:

5CCAGATCCAAATTCATCTGCTCCACTC 3'

/Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO:

5'CCAGATCCAAATTCCAACAGCTCCACTC 3'

/Thr¹²⁵, Thr¹²⁶/EPO: 5'CCAGATGGCGACAACAGCTGCTCCA 3'

/Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹/EPO:

Oligonukleotidový primer 5'AGATCCGACCACCGCTGCTCCAC 3' je použit pro přípravu /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶/EPO za použití /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO cDNA jako výchozí látky. Oligonukleotidový primer 5'TGCTCCACTCACAACAATCACTG 3' je pak použit pro přípravu /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Thr¹³¹/EPO.

/Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO a /Ser⁶⁸, Asn⁶⁹, Thr⁷¹/EPO jsou konstruovány přidáním N-glykosylačního místa k Asn 69 a zvýšením N-glykosylace na tomto místě. /Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO, /Asn¹²⁵, Thr¹²⁷, Thr¹³¹/EPO, /Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO a /Pro¹²⁴, Asn¹²⁵, Thr¹²⁷/EPO jsou konstruovány přidáním N-glykosylač-

ního místa na Asn¹²⁵ a zvýšením glykosylace na tomto místě. /Thr¹²⁵, Thr¹²⁶/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Ser¹³¹/EPO jsou konstruovány přidáním O-glykosylačního místa ke Thr¹²⁵ a zvýšením glykosylace na tomto místě.

Zdrojem erythropoietinové DNA pro in vitro mutagenesi byl plasmid Hu13, klonová cDNA lidského erythropoietinu v pUC 8 (Law a spol. Proc Natl.Acad.Sci.83, 6920 (1986)). Plasmidová DNA odvozená od Hu13 byla štěpena BstEII a BglIII restriktivními enzymy, výsledné fragmenty DNA byly podrobeny elektroforéze na agarosovém gelu a z gelu byl izolován 810 bp fragment erythropoietinové DNA za použití GeneCleanTM kitu a postupy doporučenými výrobcem (BIO 101, Inc.). Plasmid pBRgHuEPO obsahuje erythropoietinový genomový gen jako BamHI fragment inzertovaný do derivátu pBR322, jak je popsáno ve zveřejněném patentu Lina, supra. pBRgHuEPO byl také štěpen pomocí BstEII a BglIII a byl získán vektorový fragment 6517 bp. Ligace těchto dvou fragmentů vede k IGT1. Pro konstrukci pEC-1, byl pDSVL (popsaný ve zveřejněném patentu Lina, supra) štěpen BamHI a k němu byl ligován izolovaný BamHI fragment velikosti 2,8 kilobází (kb) z IGT1, obsahující erythropoietinovou cDNA.

4a účelem přípravy jednořetězcové DNA pro mutagenesi in vitro, byl pEC-1 štěpen BamHI a BglIII a byl izolován fragment 820 bp erythropoietinové cDNA. Byl ligován k BamHI místu m13mp18 za vzniku m13-EC-1. Jednořetězcová DNA byla získána ze supernatantů E.coli kmen RZ1032, infikovaného m13-EC-1 jak popsalunkel a spol. Methods in Enzymol. 154, 367 (1987) a Messing, Methods in Enzymol. 101, 20 (1983). Pro mutagenesi in vitro bylo smíšeno přibližně 1 µg jednořetězcové DNA a 0,2 pmol jednoho ze syntetických primerů popsaných výše se 6 ml pufru (250 mM Tris pH 7,8, 50 mM

MgCl₂ a 50 μ l dithiothreitolu). Pro připojení primeru k templátu byl objem reakční směsi upraven na 10 μ l vodou, směs byla zahřívána na 65 °C po dobu 5 minut a pak nechána zchladnout na teplotu místnosti. Pro prodlužovací reakci bylo přidáno 2,5 μ l dTTP, dATP, dGTP a ATP (všechny s 10 μ M), dále 1 μ l (1 jednotka) E.coli DNA polymerázy (Klenowův fragment) a 1 μ l (1 jednotka) T4 DNA ligázy. Směs pak byla inkubována přes noc při 14 °C a použita pro transformování E. coli JM 109 (Yanisch-Perron a spol., Gene 33, 103 (1985)) jak je popsáno (Messing, supra).

Pro identifikaci mutantních klonů rozlišovací hybridizací, byly plaky na nutričním agaru přeneseny na Gene Screen filtry (New England Nuclear). Filtry byly sušeny pod tepelnou lampou a pak inkubovány po dobu jedné hodiny v 6x SSC, obsahující 1 % SDS při 60 °C. Pro hybridizaci byly oligonukleotidové primery uvedené výše (8 pmol) koncově oznašeny T4 polynukleotidovou kinázou a ³²P-oznašeným ATP a inkubovány s filtry přes noc v 6x SSC, 0,5% SDS a 100 mg/ml DNA lososího sperma při 37 °C pro /Asn¹²⁴/mutaci, 55 °C pro /Asn⁴, Ser⁶/ mutaci, 65 °C pro /Thr¹²⁵/ a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/ mutace a 70 °C pro /Asn⁹, Ser¹¹/ a /Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵/ mutace. Příští den byly filtry třikrát promyty 6x SSC při teplotě místnosti a podrobeny autoradiografii. Je-li to nutné byly pak filtry promyty 6x SSC při zvýšených teplotách, dokud nebyla detegována malá nebo žádná hybridizace u plaků, majících erythropoietinovou cDNA sekvenci divokého typu. Klony, které za těchto podmínek dávají pozitivní hybridizační signály byly identifikovány a retransfektovány do JM109 k izolování čistého klonu. Dideoxy řetězcová terminační sekvenci analýza dokládá, že jsou přítomny mutace u asparaginového, serinového, threoninového a prolinového zbytku.

Dvojřetězcové m13 LC-1 DNA nesoucí /Asn⁴, Ser⁶/,
/Asn⁹, Ser¹¹/, /Asn⁶⁹/, /Asn¹²⁴/, /Asn¹²⁵/, /Ser¹²⁷/, /Asn¹⁶³,

Ser¹⁶⁵/ /Thr¹²⁵/ a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/ změny byly získány z JM109 transfektovaných buněk varnou metodou (Holmes a spol., Anal. Biochem 117, 193 (1981)). DNA byly štěpeny pomocí BstEII a XhoII a byl izolován 810 bp fragmenty erythropoietinové DNA. pEC-1 byly štěpeny BstEII s následujícím parciálním štěpením BglIII a 5' konce výsledných fragmentů se defolylatují bakteriální alkalickou fosfatázou v 10 mM Tris, pH 8 při 60 °C po 60 minut. Byl izolován 7 kb vektorový fragment postrádající 810 bp BstEII-BglIII a ligován k erythropoietinovým fragmentům uvedeným výše. Výsledné plasmidy (označené pEC-X, kde X znamená parciální mutaci) obsahují lidský erythropoietin se změněnými aminokyselinovými zbytky v označených pozicích.

cDNA klony sekvence lidského erythropoietinu a analogů odpovídajících /Asn⁴, Ser⁵/, /Asn⁹, Ser¹¹/, /Asn⁶⁹/, /Asn¹²⁴/, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/, /Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵/, /Thr¹²⁵/ a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/ erythropoietinových cDNA klonů byly transfektovány do COS-1 buněk (ATCC č. CRL-1650) elektroporací. COS-1 buňky byly z polotekutých disků odebrány, promyty mediem (modifikované Dulbecco základní médium, obsahující 5 % fetálního telecího sera a 1 % L-glutaminu/penicilinu/streptomycinu (Irvine Scientific) a resuspendují na 4 x 10⁶ buněk/ml. Jeden mililitr buněk se přenese do elektroporační kyvety (Bio-Rad) a elektroporuje Bio-Rad Gene PulseremTM při 25 μ Faradech a 1600 voltech za přítomnosti 100 až 200 μ g nosiče DNA a 2 až 20 μ g plasmidové DNA kodující erythropoietinový analog. Elektroporované buňky se umístí v koncentraci 2 x 10⁶ buněk na 60 mm misku pro tkáňovou kulturu v 5 ml media. Po dvou až čtyřech hodinách po umístění se médium nahradí 5 ml čerstvého media. Kondiciované médium se oddělí 3 až 5 dnů po elektroporaci.

A. Zkouška aktivity erythropoietinového analogu

RIA byly provedeny podle Egrie a spol., supra. In vivo biologická aktivita erythropoietinových analogů byla stanovena exhypoxickou polycythemickou biostudií na myších (Cotes a spol., supra).

In vitro erythropoietinová aktivita byla stanovena zkouškou tvorby erythroidních kolonií jak je popsáno Iscovem a spol., J. Cell Physiol. 83, 309-320 (1974) s modifikacemi. Jednojaderné buňky z buněk lidské kostní dřeně byly částečně čištěny na "ficol-paque" vložce a promyty Iscovým médiem před umístěním na plotnu pro odstranění adherentních buněk. Kultivační medium obsahuje 0,9 % methylcelulózy a neobsahuje jakýkoliv hovězí serový albumin. Erythroidní kolonie byly spočteny po 8 až 10 dnech kultivace.

Erythropoietinové analogy transfektované a exprimované v COS buňkách jak je popsáno v sekci A, byly analyzovány v surovinách supernatantech COS buněk pomocí RIA a zkouškou tvorby erythroidních kolonií. Lidské erythropoietinové sekvence né in vitro aktivitu srovnatelnou s RIA aktivitou stanovenou ve výše uvedeném pokusu. Analogy /Asn⁶⁹/EPO, /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO, /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO vykazují in vitro aktivitu srovnatelnou s RIA aktivitou a poskytuje důkaz o dalších karbohydrátových řetězcích (jak je stanoveno v sekci C). Tyto analogy jsou dále analyzovány transfekcí cDNA klonem kodujícím erythropoietinový analog do CHO buněk, čištěním erythropoietinového analogu a měřením in vivo biologické aktivity čištěného analogu.

C. Analýza Western Blot

Objem supernatantu, obsahující 5-20 jednotek z COS bu-

něk transfektovaných cDNA erythropoietinových analogů jak je popsáno v sekci A, byl imunoprecipitován přes noc při teplotě místnosti s králičí antierythropoietinovou polyklonální protilátkou. K imunoprecipitátu bylo přidáno 20 až 80 μ l 1:1 proteinu A-Sepharosy v salinickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS) a ponecháno inkubovat jednu hodinu při teplotě místnosti. Vzorky byly odstředěny, promyty PBS a kde je to indikováno, byla peleta zpracována s N-glykanázou pro odstranění N-vázaného karbohydrátového řetězce. Vzorky byly analyzovány elektroforézou na 25% SDS-polyakrylamidovém gelu, přeneseny na nitrocelulozu a podrobeny Westernově analýze jak je popsáno (Burnette a spol., Anal. Biochem 112, 195-203 (1981); Elliot a spol. Gene 79, 167-180 (1989)) za použití směsi myších antierythropoietinových monoklonálních protilátek. Jedna z takových protilátek, 9G8A, je popsána Elliotem a spol. (1989) Blood 74, Supp.1, A. 1228.

Analýze supernatantů COS buněk transfektovaných /Asn⁶⁹/EPO a /Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO cDNA dokládá zvýšení velikosti proteinu ve srovnání se sekvencí lidského erythropoietinu. Zvýšená velikost svědčí o přítomnosti dalšího N-vázaného karbohydrátového řetězce (obr.7). Zpracování supernatantů z COS buněk transfektovaných /Thr¹²⁵/EPO a /Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO cDNA s N-glykanázou dokládá zvětšenou velikost proteinu ve srovnání se sekvencí lidského erythropoietinu. Tato zvětšená velikost svědčí o přítomnosti dalšího O-vázaného karbohydrátového řetězce (obr.8).

D. Izolace isoformů erythropoietinových analogů

Erythropoietinový analog /Thr¹²⁵/EPO byl konstruován jak je popsáno v sekci A. 810 bp fragment erythropoietinové cDNA nescucí /Thr¹²⁵/mutací byl izolován štěpením plas-

mišu pEC obsahujícího /Thr¹²⁵/ mutaci pomocí BstEII a BglII a ligací fragmentu k pDEC Δ , derivátu pDS α 2. pDS α 2 je obecně popsán v US patentové přihlášce č. 501 904, která je zde uvedena pro úplnost. pDEC Δ byl připraven z pDS α 2 následujícími kroky:

- 1) HindIII místo pDS α 2 bylo deletováno štěpením pDS α 2 DNA pomocí HindIII, zpracováním HindIII kohezivních konců s E.coli DNA polymerázou (Klenow fragment) a dNTP, a religací tupě zakončeného vektoru. Výsledný plasmid je pDS α 2 Δ H.
- 2) pDS α 2 Δ H byl štěpen pomocí SallI a syntetický oligonukleotid mající SV40 "splice" signál se SallI linkerem připojeným ke 3' konci "splice" signálu byl k němu ligován. Syntetický oligonukleotid měl následující sekvenci:

```
5' TCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTAACTGGTAAGTTTAGT
GTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGCTGGTGCAAATCA
AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTACGCCCTGTACGG
AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTCCTGCAACAAGCTGCTCGACC 3'
```

Výsledný plasmid byl pDS α 2 Δ H spoj.

- 3) pDS α 2 Δ H spoj byl štěpen SallI a konce zpracovány na tupu zpracováním s kohezivními konci s T4 DNA polymerázou a dNTP. 820 bp fragment BamHI-BglII lidské erythropoietinové cDNA byl na koncích natupo zpracován stejným postupem a ligován k plasmidu. Výsledný plasmid byl pDEC.

- 4) pDEC byl štěpen s KpnI a PvuII a na koncích zpracován na tupu zpracováním s kohezivními konci "mung bean" nukleázou. Plasmid byl religován k deletovanému excisovanému KpnI-PvuII fragmentu za vzniku plasmidu pDEC Δ .

Plasmid pDEC Δ , obsahující /Thr¹²⁵/ erythropoietinovou cDNA byl transfektován do DHFR-deficientních CHO buněk. 770 ml kondiciovaného media CHO buněk byl zakonzentrován za použití dělicí membrány 10000 daltonů molekulové hmotnosti a diafiltrován proti 10 mM Tris-HCl, pH 8,6 na celkový objem 34 ml. 17ml podíl koncentrátu byl nanesen na Q-Sepharosovou kolonu s rychlým průtokem (5 ml objem náplně) ekvilibrovanou stejným pufrům a eluován lineárním gradientem 0-250 mM NaCl v 10 mM Tris-HCl, pH 8,6. Podíly frakcí z kolony, buď nezpracované nebo štěpené N-glykanázou, byly analyzovány SDS-PAGE nebo IEF a pooly (označené 2,3 a 4) byly připraveny na bázi isoforamy a/nebo karbohydrátového složení frakcí. Každý pool byl nanesen na Vydac C4 kolonu (214TPB 2030, 1 cm průměr, 1,8-2,5 ml objem náplně, 0,34 ml/min) a promyt dvěma objemy kolony 20% ethanolu v 10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Kolony byly eluovány lineárními gradienty 20-94% ethanolu, 10 mM Tris, pH 7,0. Pools byly připraveny, nařaděny do 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 a naneseny na Q-Sepharosové kolony s rychlým průtokem. Následujícím promýváním 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, byly vzorky eluovány 20 mM citrátem sodným, 250 mM NaCl, pH 7,0. Čištěné /Thr¹²⁵/ pools byly analyzovány IEF a jsou uvedeny na obr. 9. EPO analog je analyzován na in vivo biologickou aktivitu jak je popsáno výše (Cotes a spol., supra).

Vynález je popsán svými výhodnými provedeními, která však nijak vynález neomezují, neopak, jsou v něm zahrnuty různé modifikace a ekvivalenty v rámci připojených nároků, provedené v nejširším rozsahu tak, že zahrnují všechny takové modifikace a ekvivalenty.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Isoforma erythropoietinu.
2. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1, která je produktem exprese exogenní DNA sekvence v eukaryotní hostitelské buňce nehumánního původu.
3. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1, která zahrnuje erythropoietin mající aminokyselinovou sekvenci 1-155 nebo 1-166 lidského erythropoietinu.
4. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1, mající specifický počet sialových kyselin na molekulu erythropoietinu, tento počet je volen ze skupiny 1-14.
5. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1 mající více než 14 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
6. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1, mající 14 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
7. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1, mající 13 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
8. Isoforma erythropoietinu podle nároku 1, mající 10 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
9. Isoforma erythropoietinu podle nároku 2, kde uvedenou eukaryotní hostitelskou buňkou je CHO buňka.
10. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje terapeuticky účinné množství isoformy erythropoietinu

podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelné ředidlo, přísadu nebo nosič.

11. Prostředek, obsahující směs méně než 4 isoform erythropoietinu.

12. Prostředek, obsahující směs isoform erythropoietinu, mající méně než 12 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

13. Prostředek podle nároku 12, vyznačující se tím, že obsahuje směs isoform erythropoietinu mající 9, 10 a 11 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

14. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje směs isoform erythropoietinu, mající více než 11 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

15. Prostředek podle nároku 14, vyznačující se tím, že obsahuje směs isoform erythropoietinu mající 13-14 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

16. Erythropoietin, obsahující v podstatě erythropoietinové molekuly, mající specifický počet sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

17. Erythropoietin, obsahující v podstatě erythropoietinové molekuly, mající specifický počet sialových kyselin na molekulu erythropoietinu, tento počet je vybrán ze skupiny zahrnující 1-14.

18. Erythropoietin, zahrnující erythropoietinové molekuly mající více než 14 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

19. Erythropoietin podle nároku 16, mající 14 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
20. Erythropoietin podle nároku 16, mající 13 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
21. Erythropoietin podle nároku 16, mající 10 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
22. Erythropoietin podle nároku 16, kde uvedenou molekulou je produkt exprese exogenní DNA sekvence v eukaryotních hostitelských buňkách nehumánního původu.
23. Erythropoietin podle nároku 15, který má aminokyselinnou sekvenci lidského erythropoietinu.
24. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje terapeuticky účinné množství erythropoietinu podle nároku 15 a farmaceuticky přijatelné ředidlo, přísadu nebo nosič.
25. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje směs molekul erythropoietinu, majících méně než 4 sialové kyseliny na molekulu erythropoietinu.
26. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje směs molekul erythropoietinu, mající méně než 12 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.
27. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje směs molekul erythropoietinu, majících více než 11 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

28. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že obsahuje směs isoform erythropoietinu, majících 13 až 14 sialových kyselin na molekulu erythropoietinu.

29. Způsob přípravy isoformy erythropoietinu, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně zpracování čištěného erythropoietinu preparativní isoelektrickou fokusací a eluce jednotlivé isoformy z gelu.

30. Způsob přípravy směsi molekul erythropoietinu, mající více než předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu, vyznačující se tím, že se materiál, obsahující erythropoietin, zpracuje iontovýměnnou chromatografií.

31. Způsob přípravy směsi molekul erythropoietinu, majících více než předeterminovaný počet sialových kyselin na molekulu, vyznačující se tím, že se materiál, obsahující erythropoietin, zpracuje chromatofokusecí.

32. Způsob zvýšení hladiny hematokrytů u savců, vyznačující se tím, že zahrnuje podání terapeuticky účinného množství prostředku podle nároku 26.

33. Analog lidského erythropoietinu, vybraný ze skupiny, zahrnující
/Asn⁶⁹/EPO,
/Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO,
/Thr¹²⁵/EPO a
/Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO.

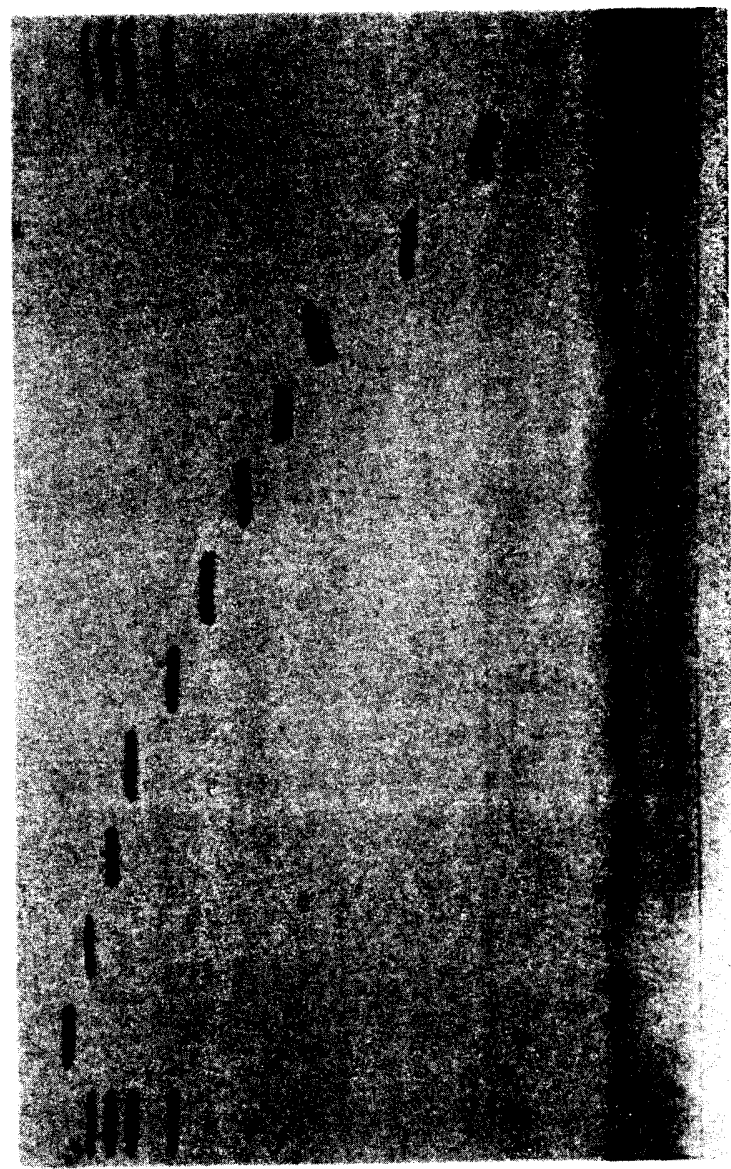
34. Čištěná a izolovaná DNA sekvence, obsahující v podstatě DNA sekvenci kodující analog lidského erythropoietinu vybraný ze skupiny zahrnující

/Asn⁶⁹/EPO,
/Asn¹²⁵, Ser¹²⁷/EPO,
/Thr¹²⁵/EPO a
/Pro¹²⁴, Thr¹²⁵/EPO.

171 81

002072

11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

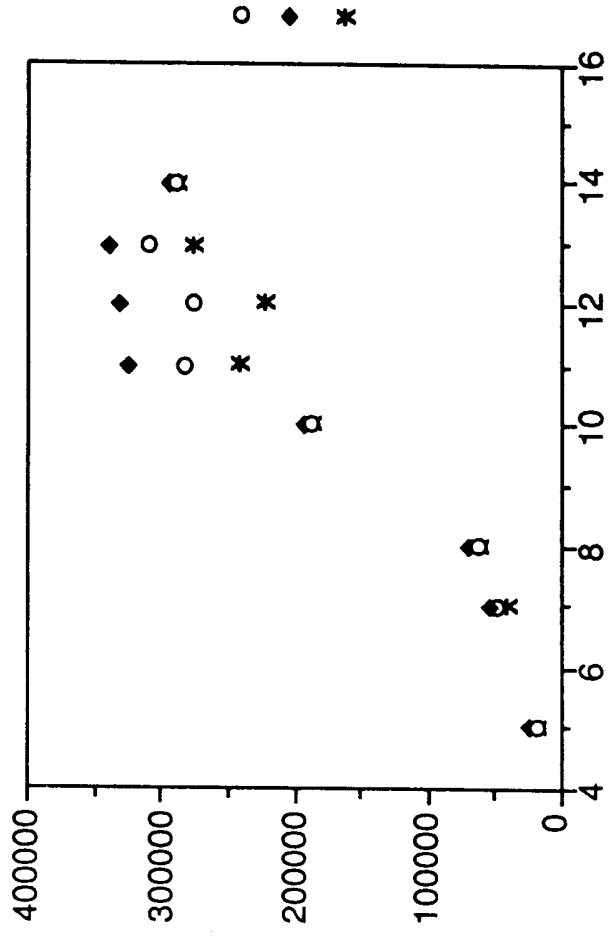


↑ 14
↑ 13
↑ 12
↑ 11
↑ 10
↑ 9
↑ 8
↑ 7
↑ 6
↑ 5
↑ 4

|

3

2A

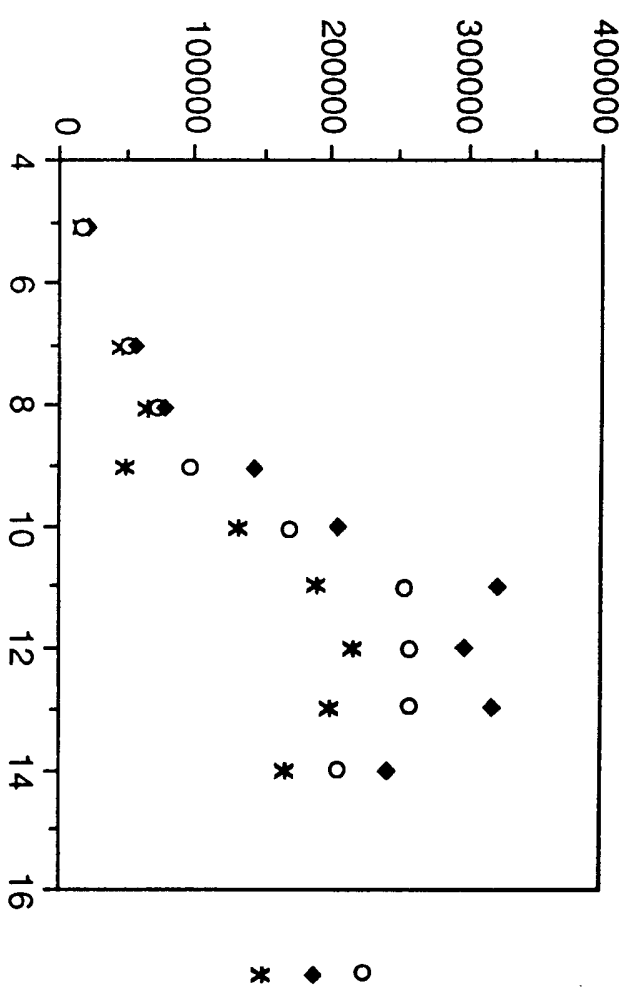


128 128

128 128

6

2B

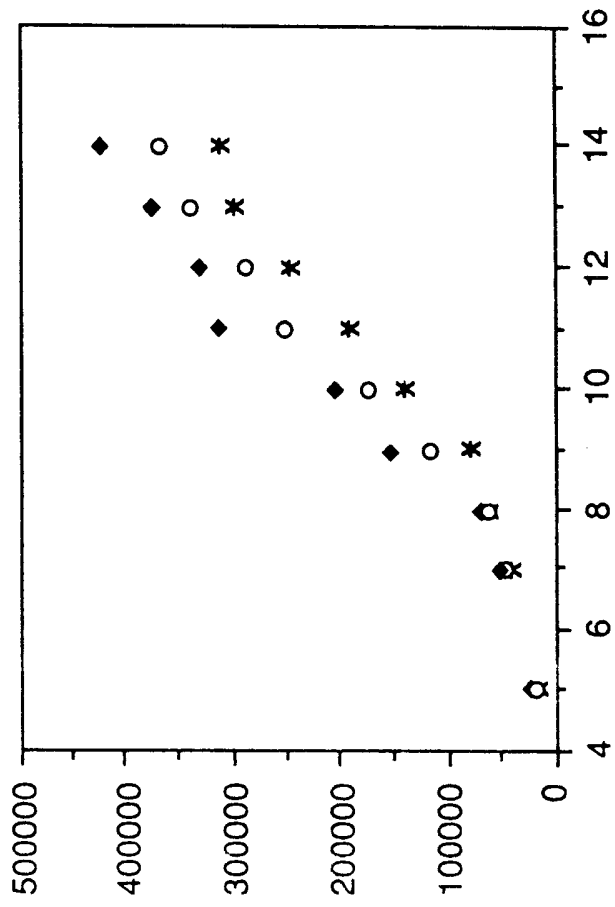


3

0.0-2072

13.1.81

2C



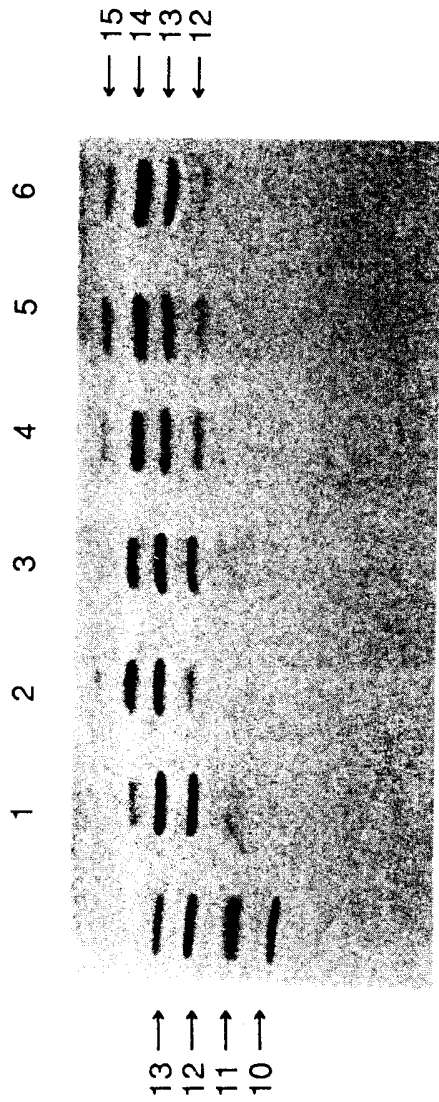
○ ◆ *

19 1 79

820708

4

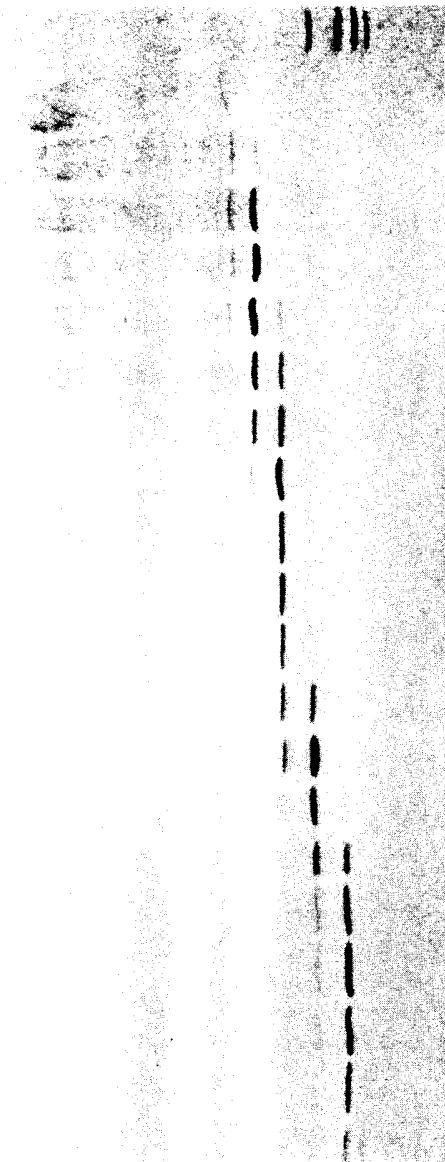
3



12.1.91

002072

7



EPOstd

2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40

↑
8
↑
9
↑
10
↑
11
↑
12
↑
13

4

002072

1118

5

-27 +1 10 20 □
MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT

↓ ↓ ↓ ↓
N S N S
□ □

30 □40 50 60 70
TGCAEHCSLNENITYPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA

↓
N
□

80 □ 90 100 110 120 130
LLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRT

*
↑ T *
↓ ↓ ↓
N N S
□ □

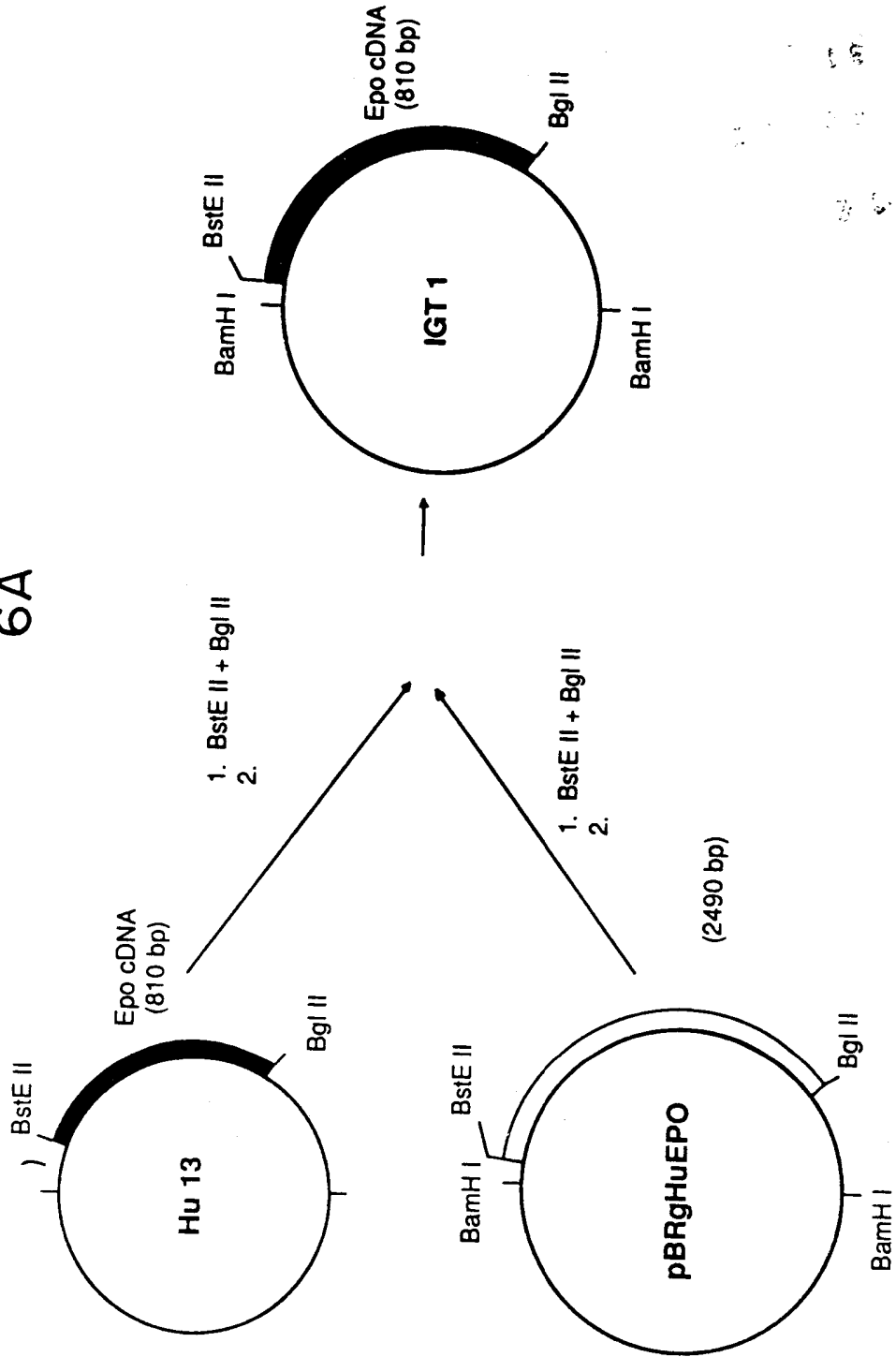
140 150 160
ITADTFRKLFVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR

↓ ↓
N S
□

□ =

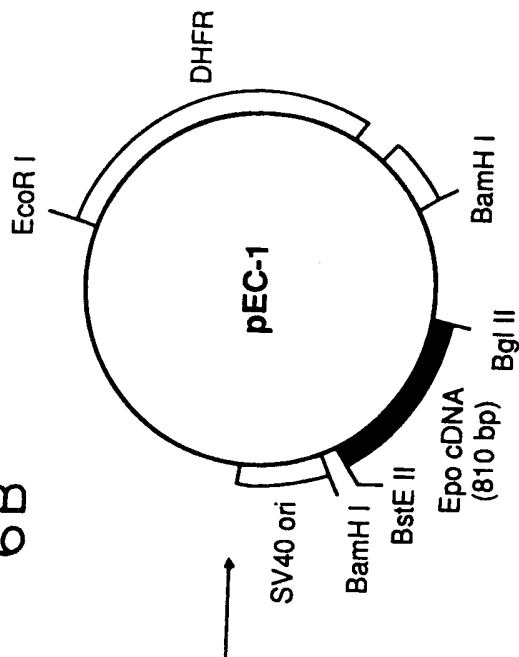
* =

6A

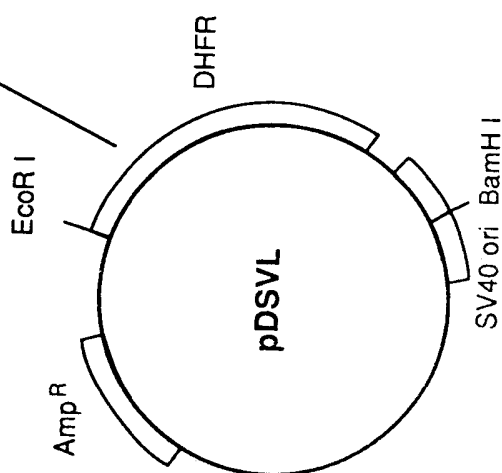


6B

IGT-1
1. BamH I
2.

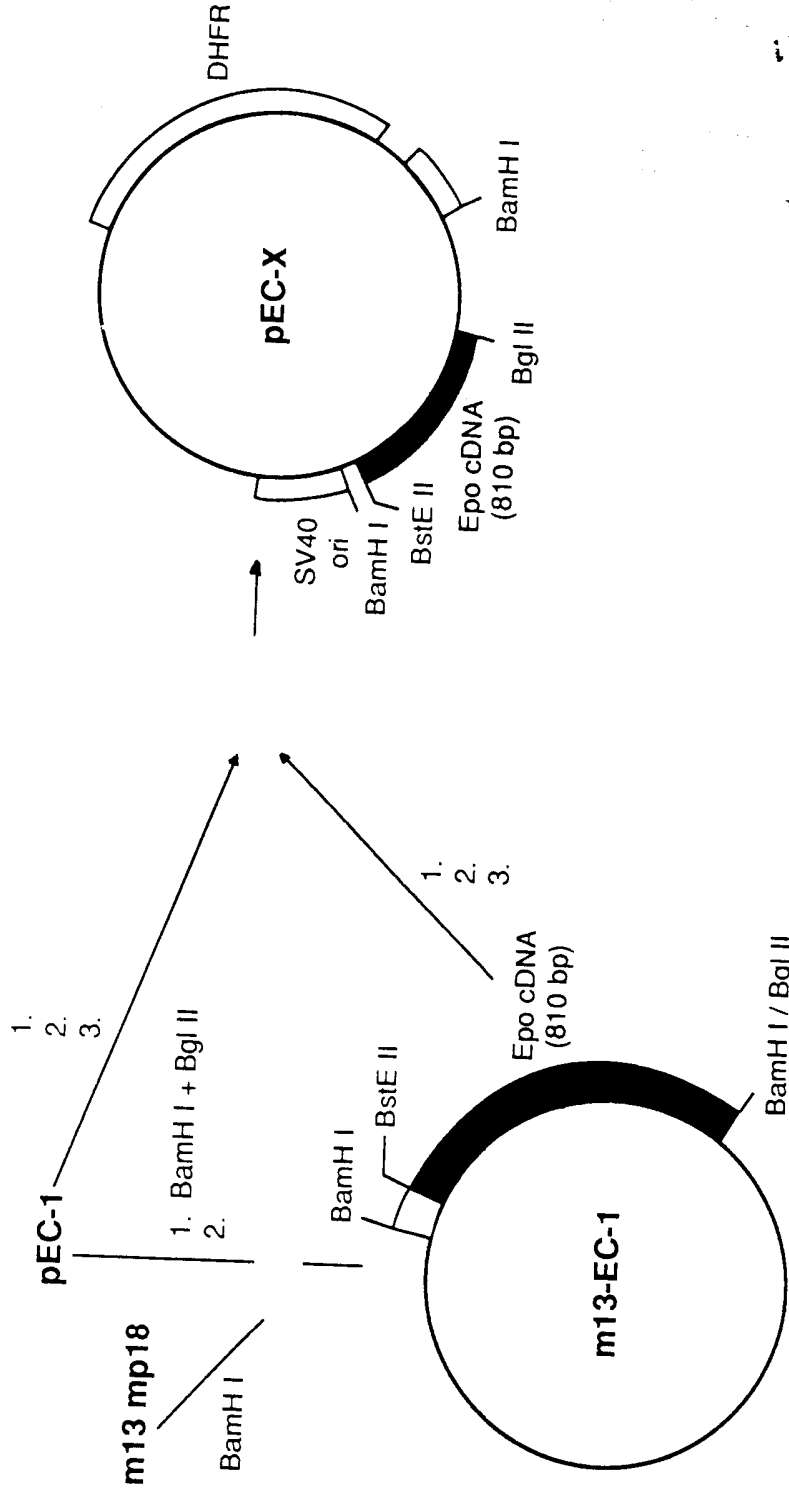


BamH I



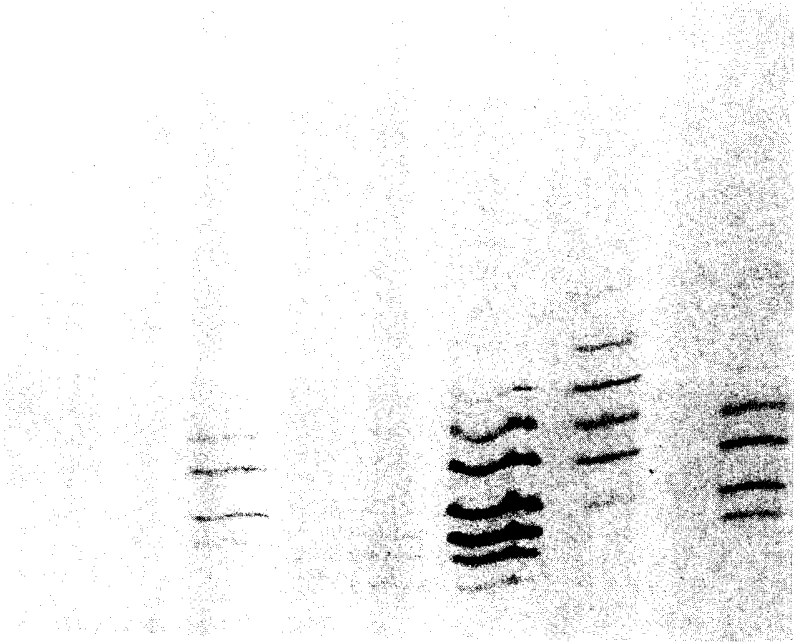
002078

6C



002078
12121

3

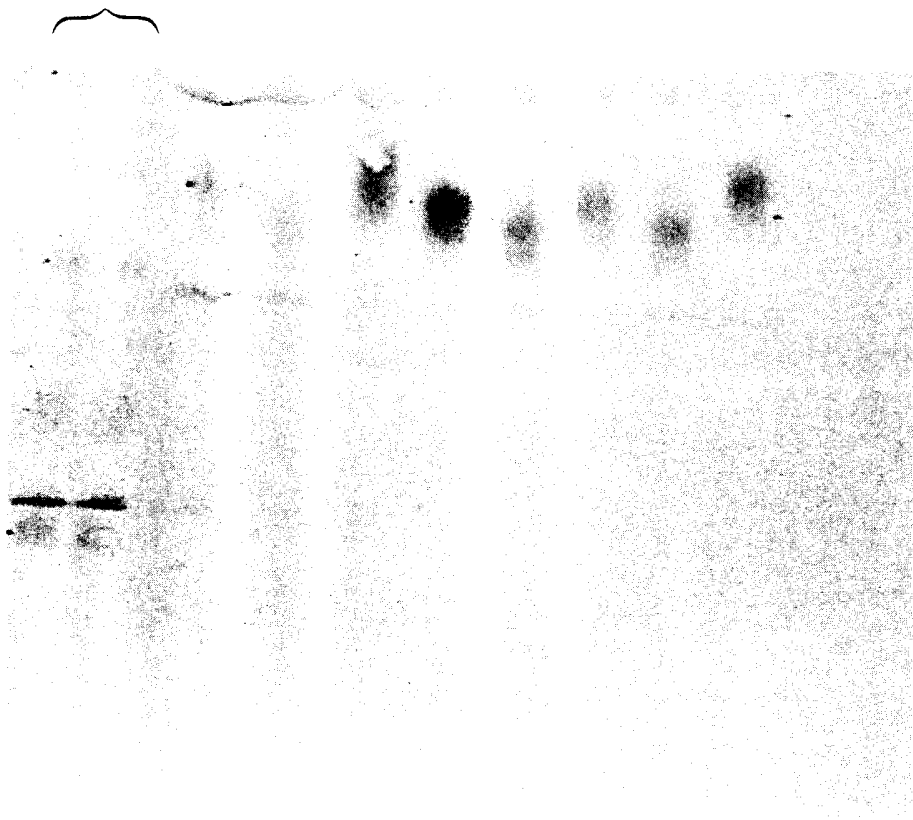


10 →
11 →
12 →
13 →
14 →
15 →

EPO
POOL 2
POOL 3
POOL 4
EPO

6

7



EPO

[Asn⁹, Ser¹¹] EPO

[Asn⁶⁹] EPO

[Pro¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

[Asn¹²⁶, Ser¹²⁸] EPO

[Thr¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

[Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO

150
100
50
0

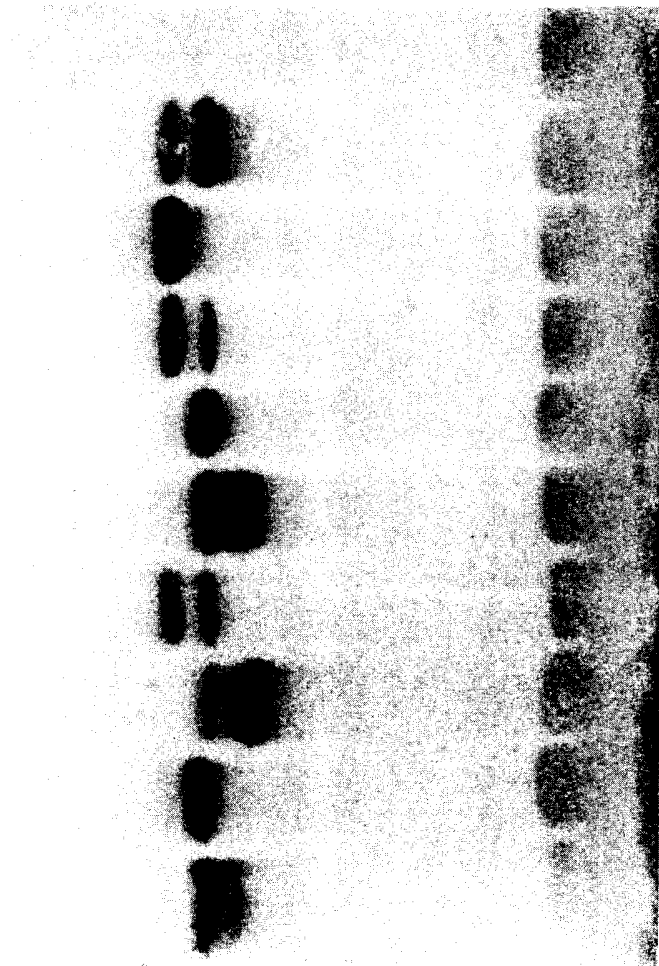
6
4
2
0
0

2

18 1 70

820300

8



COS

EPO

[Val¹²⁶] EPO

[Pro¹²⁴] EPO

[Pro¹²⁵] EPO

[Thr¹²⁵] EPO

[Thr¹²⁷] EPO

[Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO

[Pro¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

[Thr¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO

↑ ↑ ↑