

Даний винахід загалом стосується одержання рекомбінантного фактора VIII і, зокрема, одержання рекомбінантного фактора VIII у сироватці або вільному від білка середовищі.

Гемофілія А є зв'язаним з Х-хромосомами рецесивним генетичним захворюванням, яке виникає як наслідок неповноти або недостатності молекули фактора VIII, що зумовлює геморагічну тенденцію. Для контролю випадків кровотечі хворих на гемофілію лікують з використанням фактора VIII. Історично фактор VIII був виділений з плазми крові людини. Проте, терапія з використанням одержаного з плазми фактора VIII була пов'язана з перенесенням деяких людських вірусів, таких як вірус гепатиту та вірус імунodefіциту людини.

З появою технології рекомбінантної ДНК була з'ясована структура людського фактора VIII та його гену. Транскриптом гена, що походить з 26 екзонів, є молекула мРНК завдовжки 9000 основ, яка кодує білок, до складу якого входить 2351 амінокислота. Дослідження структури фактора VIII свідчать про те, що він представляє собою глікопротеїн, який містить значну кількість вуглеводневих залишків.

кДНК, яка кодує фактор VIII, була клонована і стабільно експресована в клітинах нирки новонародженого хом'яка (ВНК-21) та клітинах яєчника китайського хом'яка (СНО). Для лікування гемофілії А були розроблені промислові способи одержання рекомбінантного фактора VIII. На даний момент рекомбінантний фактор VIII одержують з клітин ссавців, підданих обробці методами генної інженерії, таким чином уникаючи необхідності застосування плазми і зводячи до мінімуму будь-який можливий ризик перенесення вірусів.

Ампліфікація генів була способом, із застосуванням якого одержували високопродуктивні клітинні лінії для одержання білків терапевтичного призначення. Стратегія ампліфікації полягає в прив'язуванні транскрибованої ділянки, яка кодує цільовий білок, до ампліфікованого маркера, такого як дигідрофолатредуктаза. Потім для перенесення векторної ДНК до клітин-реципієнтів застосовують техніку трансфекції. Відбирають популяції клітин з підвищеною резистентністю до вибраного препарату, такого як метотрексат. Одержання стійкого клітинного клону досягають шляхом клонування граничних розведень. Потім ці клітинні клони адаптують до вільного від сироватки продукційного середовища і контролюють для одержання цільового білка.

У процедурах одержання та очищення лабільних білків, таких як фактор VIII, в якості стабілізатора додають людський альбумін. Хоча альбумін піддають вірусній інактивації шляхом пастеризації, ідеальною була б можливість одержання рекомбінантного фактора VIII при повній відсутності білків крові людини та тварин. Було виявлено, що це можливо при використанні нового культурального середовища. Деталі описані нижче.

Спосіб неперервного одержання відносно великих кількостей рекомбінантного фактора VIII (рФ VIII) з клітин ссавців при відсутності будь-яких людських або одержаних від тварин білків плазми полягає в культивуванні клітин-хазяїв ссавця в середовищі, вільному від білка, з додаванням поліольного полімера, такого як Плуоронік F-68. Середовище, якому надають перевагу, містить сульфат міді, комплекс сульфату заліза з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА) та солі мікроелементів, таких як марганець, молібден, кремній, літій і хром.

Останні досягнення в технології експресії рекомбінантного білка дали змогу одержувати білок у великих кількостях у клітинах ссавців. Клітини-хазяї, придатні для одержання фактора VIII, включають такі клітинні лінії, як клітини нирки новонародженого хом'яка (ВНК), клітини яєчника китайського хом'яка (СНО) та людські ембріональні клітини нирки (НЕК). Особлива перевага надається клітинам нирки новонародженого хом'яка, особливо тим, які трансфіковані геном, здатним направляти експресію фактора VIII, як описано у Wood та ін. (1984) (включно з похідними, такими як клональні варіанти та їх потомство). Така клітинна лінія була депонована в Американській колекції типових культур, їй було присвоєно вхідний номер ATCC CRL-8544.

Необхідна лінія клітин-хазяїв, яка несе ген фактора VIII, звичайно адаптується до росту у вигляді суспензійних культур у вільному від білка середовищі продукування, до якого додають ліпопротеїн. Основне середовище, вибране для культивування лінії клітин-хазяїв, не є суттєвим для даного винаходу і може бути одним із середовищ, відомих фахівцям, або поєднанням таких середовищ, що застосовуються для культивування клітин ссавців. Такі середовища, як модифіковане середовище Дюльбекко-Ігла, середовище Хема F-12, мінімальне основне середовище Ігла, середовище RPMI-1640 та подібні є комерційно доступними. Додавання факторів росту, таких як рекомбінантний інсулін, є відомих фахівцям в даній галузі.

За рахунок лабільної природи фактора VIII продуктивність клітин-хазяїв, що були піддані генно-інженерній обробці, в умовах відсутності білка значною мірою знижена. Для одержання рекомбінантних білків звичайно застосовують людський сироватковий альбумін в якості безсироваткової культуральної добавки. Людський сироватковий альбумін виконує ряд функцій включно з: (1) функцією носія жирних кислот, холестерину і ліпофільних вітамінів, стероїдних гормонів та факторів росту; (2) функцією захисного агента від ушкодження клітин внаслідок сил зсуву; (3) функцією буфера при змінах значень рН; і (4) функцією регулятора осмотичного тиску. Інша важлива роль альбуміну полягає в захисті лабільних білків, таких як фактор VIII, від протеолізу, служачи при цьому субстратом для протеаз.

Домішки, присутні в препаратах альбуміну, також можуть сприяти стабілізуючому ефекту альбуміну. Для одержання рекомбінантного фактора VIII в безсироваткових умовах в якості заміників людського сироваткового альбуміну були ідентифіковані такі фактори, як ліпопротеїн (Chan, 1996).

Спроба заявника створити середовище для продукування, яке не містить виділеного з людської плазми альбуміну, привела до відкриття об'єкта даного винаходу - основного середовища, вільного від білка, для одержання рекомбінантного фактора VIII. Середовище, якому надається перевага, складається з модифікованого Дюльбекко мінімального основного середовища і середовища Хема F-12 (50:50 за вагою) з додаванням 10мкг/мл рекомбінантного інсуліну (Нуцелін, фірма Еллі Ліллі), а також 50мкМ FeSO₄·EDTA (комплексу сульфату заліза з етилендіамінтетраоцтовою кислотою). У цьому основному середовищі, вільному від білка, клітини ВНК, які були піддані генно-інженерній обробці, росли добре, за винятком продукування фактора VIII.

Несподівано було виявлено, що додавання поліолу, такого як плуоронік F-68, не вплинуло на ріст клітин ВНК, але підвищило їх специфічну продуктивність відносно фактора VIII. Також додавання сульфату міді далі

посилило утворення фактора VIII. Також включення до середовища мікроелементів, таких як марганець, молібден, кремній, літій і хром, приводить до ще більшого посилення утворення фактора VIII. Потім було розроблено неперервний спосіб продукування фактора VIII в умовах відсутності одержаного з людської плазми білка. Подальшу інформацію стосовно використання поліолів типу пліороніка можна знайти в роботах Papoutsakis (1991) і Schmolka (1997).

Пліоронік F-68, полігліколь (фірма БАСФ, Вйандот) звичайно використовують для запобігання спіненню при перемішуванні культур, для захисту клітин від руйнування та від ушкодження бульбашками барботованій культурі. Пліоронік F-68 є неіонним блоковим співполімером із середньою молекулярною масою 8400 і складається з центрального блоку поліоксипропілену (20ваг. %) і блоків поліоксиетилену на обох кінцях. Чисельні дослідження ролі пліороніка F-68 свідчать, що він діє як поверхнево-активна речовина і запобігає пошкодженню клітин, шляхом відведення клітин від бульбашок, які утворюються у біореакторах при перемішуванні або барботуванні. Однак, деякі дослідники відзначили сприятливу дію пліороніка F-68 на ріст культури в умовах мінімального пошкодження (Mizrahi, 1975; Murhammer і Goochee, 1990). Співочищення ліпідів з пліороніком F-68 під час очищення продукту підтверджує парадоксальний факт, що полімер Пліоронік може не тільки замінювати альбумін в якості поверхнево-активної речовини, але й діяти в якості носія ліпідів. Пліоронік F-68 може також запобігати пошкодженню мембрани вбиваючими клітинами ще до того, як відбудеться репарація, шляхом передбаченого безпосереднього інтерналювання в мембрану. Роль пліороніка F-68, який діє в якості метал-іонного буфера, є зовсім невиченою.

Незважаючи на повідомлення про те, що пліоронік F-68 при додаванні в середовище може підвищити об'ємну продуктивність, механізм його дії, очевидно, полягає у підтриманні життєздатності клітин (Schneider, 1989; Qi, 1996). За наявними у заявника даними вперше показано, що пліоронік F-68 посилює специфічне продукування конкретного білкового продукту. Оскільки в заявленій системі життєздатність клітин і швидкості їх росту при додаванні пліороніка F-68 і без нього є співставлюваними, то у даному випадку механізм дії пліороніка F-68 не полягає у підтриманні життєздатності клітин. Однак, яким би не був механізм його дії, ефект додавання пліороніка F-68 проявляється швидко і помітно.

Передбачається, що ряд інших поліолів може виявляти подібну дію. Такі поліолі включають неіонні блокові співполімери поліоксиетилену і поліоксипропілену, які мають молекулярну масу від приблизно 1000 до приблизно 16000.

Окрім звичайного обладнання для суспензійного культивування, такого як струшувані посудини, обертальні посудини та перекочувані по роликовому настилу бутілі, спосіб згідно з даним винаходом може також застосовуватися для біореакторів неперервної та періодичної дії. Після культивування клітин-хазяїв фактор VIII може бути виділений з відпрацьованого середовища з допомогою стандартних прийомів, таких як ультрафільтрація або центрифугування. При необхідності регенований фактор VIII може бути очищений хроматографією, наприклад іонообмінною, ексклюзійною, імуно-афінною або метал-хелатною і т. п.

Використовуваний тут термін "середовище, вільне від білка людини або тварини" означає культуральне клітинне середовище, в якому немає білків, одержаних від людини або тварини. Білки, виділені з людських джерел або від тварин, спадково супроводжуються ризиком вірусного інфікування. Ціллю створення середовища, вільного від білка людини або тварини є виключення або принаймні значне зниження небезпеки передачі вірусу.

Приклад 1

Клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK-21), трансфіковані геном, здатним направляти експресію фактора VIII, були одержані від фірми Дженентек, Інк., Південний Сан-Франциско, Каліфорнія, США (Genentech, Inc.). Клітинна лінія була одержана, як детально описано у Wood та ін. (1984), і депонована в Американській колекції типових культур під вхідним номером ATCC CRL-8544. Клональний варіант цих клітин одержували також від фірми Дженентек, Інк., і застосовували в усіх прикладах.

Клітини BHK-21, які містять ген, що кодує фактор VIII, культивували у вигляді суспензійних культур у струшуваних посудинах із застосуванням безсироваткового основного середовища, яке містило: середовище Хема F-12 і мінімальне основне середовище Дюльбекко (50:50 за вагою), нуцелін (рекомбінантний інсулін, 5-10мкг/мл), комплекс ЕДТА з FeSO₄ (50мкМ) і MgCl₂ (15мМ). Клітини витримували і пасажували з 48-годинними інтервалами. Клітини центрифугували при 800 x g протягом 5 хвилин, рахували і пересівали з густиною 1x10⁶ клітин/мл. Кожна посудина містила 50-100мл свіжого середовища. Посудини для струшування розташовували на обертальному пристрої, інкубували при 37°C і підтримували у вигляді суспензійної культури шляхом обережного обертання із швидкістю 90-110 обертів/хвилину. Вплив поліолу, такого як пліоронік F-68 (0,1%), позначеного нижче як F-68, і сульфату міді (50нМ) на продукування фактора VIII досліджували у посудинах для струшування. Фактор VIII кількісно визначали хромогенним аналізом. Реагенти для аналізу комерційно доступні у вигляді тест-набору, відомого під назвою Коатест VIII:C/4 (Coatest VIII:C/4), який поставляється фірмою Бекстер Хелс Кеєр Продактс (Baxter Healthcare Products). Таким способом клітини підтримувались протягом 24 днів. Активність фактора VIII у кожному середовищі, визначена з допомогою Коатест VIII:C/4, наведена у Таблиці 1.

Таблиця 1

Умови	Титр (Од/мл)	Специфічна продуктивність (мкОд/клітину/день)	Збільшення у % порівняно з основним середовищем
Основне середовище	0,15 ±0,07*	0,026±0,013	0

Основне середовище + F-68(0,1%)**	0,24±0,04	0,052±0,013	200
Основне середовище + F-68 (0,1%) + Си (50 нМ**)	0,42±0,09	0,091±0,013	350

• Середнє значення від 36 зразків \pm стандартне відхилення. Утворення фактора VIII в клітинах контролювали протягом 24 днів, як описано вище.

** Титрувальні експерименти показали, що оптимальна доза пліуроніка F-68 становить 0,1%. Збільшення концентрації до 0,3 % не виявило значного впливу на утворення фактора VIII. Залежні від дозування експерименти показали, що для утворення фактора VIII оптимальною є концентрація сульфату міді 50-800нМ.

Як показано в Таблиці 1, в умовах відсутності білка додавання лише самого пліуроніка F-68 або, переважно, в поєднанні з сульфатом міді значно підвищує титр і специфічну продуктивність клітин ВНК, які містять ген, який кодує фактор VIII.

Приклад 2

З метою подальшої оптимізації способу одержання фактора VIII в умовах відсутності білка, до вільного від білка продукційного середовища додавали мікроелементи. Утворення фактора VIII оцінювали з використанням культуральної системи неперервно струшуваних посудин, як описано у прикладі 1, протягом 16 днів. Дані наведені у Таблиці 2. При відсутності сульфату міді мікроелементи не виявляли впливу на продукування фактора VIII. Див. Таблицю 2.

Таблиця 2

Умови	Титр (Од/мл)	Специфічна продуктивність (мкОд/клітину/день)	Збільшення у % порівняно з основним середовищем + F-68
Основне середовище +F-68	0,46±0,11	0,065±0,013	0
Основне середовище +F-68+Си	0,53±0,15	0,078±0,026	120
Основне середовище +F-68+Си+метали*	0,73±0,16	0,104±0,026	160

• Метали включають $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (50нМ), MnSO_4 (3нМ), $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1,5мкМ), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3нМ), $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,5нМ) і LiCl (236нМ).

Приклад 3

Вплив мікроелементів і міді на продукування фактора VIII далі оцінювали в перфузійному ферментері. Два ферментери по 1,5л кожен засівали клональним варіантом клітин ВНК з густиною 2×10^6 клітин/мл із застосуванням основного середовища, описаного у Таблиці 1. Ферментер перфузували із швидкістю 0,5л/день. Один ферментер служив контролем, у другий додавали мідь та мікроелементи, як описано у Таблиці 2. У ферментерах підтримували середню густину клітин на рівні приблизно $2-3 \times 10^6$ клітин/мл протягом 15 днів. Як показано в Таблиці 3, при відсутності білка додавання пліуроніка F-68, міді і мікроелементів в умовах безперервної перфузії значно посилювало специфічну продуктивність клітин ВНК, які містять ген, що кодує фактор VIII. Цей спосіб одержання може бути легко адаптований до більших ферментерів (200-500л), оснащених пристроєм, який утримує клітини, таким як сепаратор.

Таблиця 3

Дні	Специфічна продуктивність (мкОд/клітину/день)	
	Основне середовище	Си+метали
1	0,02	0,04
2	0,02	0,05
3	0,02	0,045
4	0,018	0,05
5	0,02	0,05
6	0,035	0,060
7	0,025	0,055
8	0,02	0,04
9	0,025	0,06
10	0,02	0,065
11	0,025	0,070

12	0,025	0,065
13	0,02	0,060
14	0,03	0,06
15	0,02	0,05

Наведені вище приклади є лише ілюстрацією і не носять обмежувального характеру для даного винаходу, об'єм охорони якого визначається формулою винаходу.