

(19)



(10) **LT 2010 012 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2010 012**

(51) Int. Cl. (2011.01): **C07K 1/00**
C07K 14/00
A61K 38/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2010 02 10**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2011 08 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

UAB PROFARMA, V, Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Edita MIŠTINIENĖ, LT
Milda PLEČKAITYTĖ, LT
Mindaugas ZAVECKAS, LT
Gintautas ŽVIRBLIS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Granulocitus stimuliuojančio baltymo linijiniai oligomerai su prailginta in vivo
gyvavimo trukme

(57) Referatas:

Išradime pateikiami rekombinantinio baltymo - granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (G-CSF), struktūriniai variantai, linijiniai oligomerai, gauti genetiniu būdu, kurie pasižymi naujomis farmakodinaminėmis ir farmakokinetinėmis savybėmis, tokiomis kaip prailgintu gyvavimu (cirkuliacija) kraujo plazmoje bei ilgesniu biologinio poveikio išlaikymu lyginant su monomeriniu baltymu. Atskleidžiami struktūriniai bei technologiniai ypatumai, leidžiantys gauti pagerintų terapinių savybių rekombinantinius baltymus, kuriuos galima pritaikyti biofarmacinėje pramonėje ir medicinoje.

GRANULOCITUS STIMULIUOJANČIO BALTYMO LINIJINIAI OLIGOMERAI SU PRAILGINTA *IN VIVO* GYVAVIMO TRUKME

5 Išradimo sritis

Šis išradimas priskirtinas biotechnologijos sričiai. Jis atskleidžia rekombinantinio granulocitus stimuliuojančio baltymo, tokio kaip granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (G-CSF), struktūrinius variantus, būtent linijinius dimerus, pasižyminčius naujomis farmakodinaminėmis ir farmakokinetinėmis savybėmis, o svarbiausia - prailgintu gyvavimu (cirkuliacija) kraujo plazmoje, lyginant su natūraliu monomeriniu baltymu.

Išradimo technikos lygis

Rekombinantinės DNR metodais gaunamų, terapinės paskirties baltymų naudojimas per pastaruosius kelis dešimtmečius pasiekė naujas aukštumas. Jų pagrindu gaminamų biofarmacinių produktų (eritropoetino - EPO, žmogaus augimo hormono - hGH, interferono - IFN, insulino, granulocitų (makrofago) kolonijas stimuliuojančių faktorių - G-CSF arba GM-CSF, folikulas stimuliuojančio faktoriaus - FSH, trombopoetino - TPO, trombolitikų) metinės pasaulinės gamybos apimtys jau viršija dešimtis milijardų dolerių ir toliau didėja. Biotechnologijos pažanga skatina tobulinti rinkoje esančių inovacinių (dar vadinamų pirmos kartos) baltyminių produktų efektyvumą, saugumą ir pateikimo ligoniui būdus. Aktyviai kuriami sekančios (antros ir trečios) kartos biofarmaciniai produktai, kurių išskirtinis bruožas – prailgintas (prolonguotas) terapinis veikimas *in vivo*. Prolonguoto veikimo vaistinės formos, kuriuose veiklioji medžiaga yra chemiškai arba genetiškai modifikuoti terapiniai baltymai su prailgintu cirkuliacijos *in vivo* laiku turi akivaizdžių pranašumų. Tokios prolonged veikimo vaistinės formos injekuojamos pacientui ne kasdien kaip įprastinės, o vieną kartą per savaitę ar mėnesį. Tai suteikia pacientui nepalyginamai daugiau saugumo garantijų ir patogumų.

Bendru atveju baltymo pasišalinimo greitį galima lėtinti didinant baltymo molekulinę masę arba jos neigiamą krūvį. Taigi baltymo gyvavimo *in vivo* trukmė bendru atveju gali būti keičiama dviem baltymo struktūros keitimo būdais: a) didinant terapinio baltymo molekulę: tai gali būti pasiekama konjuguojant baltymo molekules su polimerinės prigimties molekulėmis arba konjuguojant baltymą (chemiškai arba genetiniu būdu) su kitu neaktyviu baltyminiu partneriu, kuris pasižymi ilgesne gyvenimo trukme nei tikslinis baltymas, b) keičiant terapinės paskirties baltymo struktūrą: tai gali būti pasiekama papildomai prijungiant angliavandenių struktūras glikozilinimo pagalba (*in vivo* arba *in vitro*), kuris gali būti atliekamas tiek cheminiu, tiek ir genetiniu būdais.

Yra žinomi cheminio modifikavimo būdai siekiant išgauti terapinių baltymų prolongavimo efektus. Pastarieji gali būti konjuguojami su polietilenglikoliais, dekstranais, kitais angliavandeniais arba susiuvami su kitais baltymais. Labiausiai išvystytas ir aktyviai patentuotas (tarp kitų WO 2004/083242 A1, 2004) cheminio modifikavimo būdas yra

5 pegilinimas (polietilenglikolio, sutrumpintai – PEG vienos arba kelių grandinių prijungimas). Pagrindinis pegilinimo trūkumas susiveda į dažnai stebimą ženklų modifikuojamo baltymo biologinio aktyvumo kritimą, daugiausia dėl PEG molekulės pakankamai didelio hidrodinaminio skersmens, kas gali sukelti erdvinis trikdžius baltymo sąveikai su receptoriais.

10 Tikslinio baltymo molekulės dydis (erdvinis tūris) ir gyvavimo *in vivo* puslaidis gali būti pakeliamas ne tikta jį konjuguojant su polimerais (PEG, dekstranu ir pan.), bet ir su kitais didesnio molekulinio dydžio baltymais – „nešikliais“, pavyzdžiui, su serumo albuminu. [Poznansky M. J., In vitro and in vivo activity of soluble cross-linked uricase-albumin polymers: a model for enzyme therapy. Life Sci. 1979 vol. 24(2), p.153–158].

15 Cheminiai susiuvimo metodai leidžia kurti prailginto veikimo terapinius baltymus naudojant įvairius baltyminius partnerius, tame tarpe ir specifinius antikūnus. Yra žinomi keli chemiškai susiūti imunomolekulių dariniai (šiuo atveju monokloniniai antikūnai – Mak), pavyzdžiui, doksorubicino-Mak ir kalicheicino-Mak konjugatai yra I-os fazės klinikiniuose tyrimuose [Sievers E.L. et al., Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted

20 chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood*, vol. 93(11): p. 3678–84, 1999].

Pastaruoju metu analogiškos konstrukcijos yra kuriamos, suliejant tikslinį baltymą (*angl.* fusion protein) su jo partneriu, pasitelkus rekombinantinės DNR techniką. Skirtingai nuo

25 cheminio, genetinis sulieto baltymo gavimo būdas įgalina gauti atsikartojančios kokybės produktus, kas itin svarbu pateikiant juos tolimesniems klinikiniams tyrimams. Tačiau bet koks tikslinio baltymo modifikavimas gali sukelti dalinį jo biologinės funkcijos/aktyvumo praradimą arba iššaukti nepageidaujamus imuninio atsako reiškinius.

Tikslinio baltymo partnerių ratas sulietuose konstrukcijose paprastai apima:

30 a) imunoglobulinų domenais: mažiausio dydžio imunoglobulinų dalys – tai viengrandžiai variabilūs antikūnų fragmentai (scFv), kurie gali būti ekspresuojami daugelyje sistemų kaip V_L – V_H poros, susiūtos tarpusavyje su dirbtiniais linkeriais Gly/Ser. Suliejant citokinus arba baltymus toksinus su scFv yra gaunami terapinės paskirties imunocitokinais ir imunitoksinais. Kai kurie imunitoksinais – kaip pvz., anti-Tac (Fv)-PE 38 buvo panaudoti

35 klinikoje gydant vėžiu sergančius ligonius, kuriems kitos terapijos buvo neveiksmingos [Kreitman R.J. et al, Phase I trial of recombinantimmunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. J. Clin. Oncol. 2000;18:1614–36]. Toksiškumas ir

imunogeniškumas riboja platesnį tokių sulietų produktų taikymą terapijoje. Pastarųjų nepageidaujamų reiškinių sumažinimui tikslinis baltymas tokioje sulietoje formoje papildomai pegilinamas per Lys liekanos amino grupę arba įvedant Cys liekaną taškinės mutacijos pagalba. Tokį metodinį sprendimą kompanija Bolder BioTechnology panaudojo, kuriant

5 prolanguoto veikimo G-CSF, augimo hormono, EPO bei IFN imunosulietas konstrukcijas su taškiniu specifiniu pegiliniu.

b) žmogaus ir kitus gyvulinės kilmės albuminus: 1992 m. prancūzų mokslininkų grupė parodė, kad cheminis augimo hormono ir albumino konjugatas pasižymi lėtesniu išvedimo *in vivo* greičiu, ir netrukus paskelbė apie rekombinantinio CD4-albumino sulieto baltymo ekspresiją (Lu H., et al., FEBS Lett., 1994) *Kluveromyces* mielėse. Tokiu būdu tirpaus CD4 išvedimo puslaikis buvo padidintas beveik 140 kartų. Ta pati mokslininkų grupė pasiekė šiose mielėse efektyvią urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus ir žmogaus albumino sulieto baltymo sekreciją. Human Genome Sciences ir CoGenesys kompanijos paskelbė apie sukurtas prolanguoto veikimo terapinių baltymų – EPO, hGH, G-CSF, IFN alfa formas,

10

15 genetiškai suliejant tikslinius baltymus su žmogaus albuminu, bei jų pateikimą klinikinėms studijoms.

Alternatyvus tikslinio baltymo cheminio prijungimo arba genetinio suliejimo su albuminu metodui yra prolongavimo efekto generavimas, priverčiant tikslinį baltymą tapti *in vivo* specifiniu albumino ligandu. Taip cheminio konjugavimo keliu polistirolio ir maleino rūgšties

20 kopolimeras, prijungtas prie superoksid-dismutazės (SOD), suteikė jai sugebėjimą specifiškai rišti su albuminu *in vivo*. To išdavoje, SOD pasišalinimas iš žiurkių organizmo pailgėjo nuo 4 min. iki 6 val. [Inoue M. et al, Synthesis of a superoxide dismutase derivative that circulates bound to albumin and accumulates in tissues whose pH is decreased, *Biochemistry*, 1989, 28 (16), p. 6619–6624].

25 Sukurtos modifikavimo technologijos, siekiant prailginti baltymų buvimo *in vivo* trukmę, buvo išbandytos eilei terapinės paskirties baltymų, tačiau tik nedaugelis jų pateko į rinką. Tai Amgen korporacijos sukurtas prolanguoto veikimo EPO – Aranesp (papildomas glikozilinimas) ir G-CSF – Neulasta (pegilintas G-CSF), bei Roche ir Schering-Plough pegilinti interferonai alfa 2a - Pegasys ir alfa-2b – PEG-Intron'as.

30 Esamos technologijos ir metodiniai sprendimai siekiant prailginti terapinių baltymų gyvavimo trukmę turi keletą joms būdingų trūkumų. Baltymo molekulės dydžio (tūrio) didinimas, jungiant polimerus arba kitus baltymus, sukuria pakankamai didelės masės galutinį darinį, kuriame tikslinis baltymas gan dažnai gali prarasti (pilnai arba dalinai) sugebėjimą specifiškai sąveikoti su ląstelės receptoriais, taip netekdamas savo biologinio efektyvumo. Kuo

35 mažesnis tikslinis baltymas, tuo ši problema darosi rimtesnė. Šiai dienai sėkmingi bandymai pasiekti su pakankamai dideliais terapiniais baltymais. Tačiau net ir tokiu atveju modifikuoto baltymo biologinis aktyvumas yra ženkliai žemesnis, lyginant su intaktiniu nemodifikuotu

baltymu, dėl ko vaistinėse dozėse tokio modifikuoto darinio kiekis turi viršyti nemodifikuoto baltymo kiekį.

- Papildomo glikozilinio atveju (t.y. įvedant naujus, gamtoje nesutinkamus glikozilinio taikinius baltymo aminorūgščių sekoje) technologiniai sprendimai dažniausiai reikalauja baltymo genetinės struktūros pokyčių, pavyzdžiui, taškinių mutacijų įvedimo. Tokia modifikuoto baltymo struktūra jau yra naujas darinys, dažnai sukeliantis netikėtas pašalines reakcijas ir toksinius reiškinius.

- Patentinėje literatūroje pateikiama nedaug medžiagos apie linijinių multimerinių baltymų struktūras. Patente EP1334127 (A1) yra paminėta apie multimerinių baltymų (daugiausiai citokinių, tarp jų ir G-CSF) kovalentinio sujungimo galimybę bei papildomos polimerinės grandinės (PEG ar kitos kilmės) prijungimą prie multimerinio baltymo. Šis patentas nepateikia informacijos apie linkerinės sekos įtaką multimerinio baltymo biologiniam aktyvumui.

- Patentinė paraiška WO9206116 (A1) atskleidžia heterodimerinių rekombinantinių baltymų galimybes skatinti hemapoetinių ląstelių mieloidinę ankstyvąją ir vėlyvąją diferenciaciją. Pirmoji molekulė gali būti IL-3 ar GM-CSF, antroji - EPO, G-CSF, IL-5 ar M-CSF.

Patentinė paraiška WO0103737 (A1) atskleidžia sulietų baltymų, sudarytų iš citokino ar augimo faktoriaus, sulieto su imunoglobulino domenu (pvz. IgG) gavimo galimybę ir savybes.

- Yra žinoma [Paige A.G. et al. "Prolonged circulation of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor by covalent linkage to albumin through a heterobifunctional polyethylene glycol" Pharm. Res. 1995, 12(12):1883-8] apie prailgintą rhG-CSF cirkuliaciją, kai šis baltymas kovalentiškai surištas su serumo albuminu per heterobifunkcinį agentą maleimido-karboksilpolietilenglikolį. Panaši idėja suliejant augimo hormono ir albumino molekules atskleista ir Poznansky straipsnyje [Poznansky M. J. et al. "Growth hormone-albumin conjugates. Reduced renal toxicity and altered plasma clearance." FEBS Lett. Oct. 24, 1988; 239(1):18-22].

- Granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktorių (G-CSF) struktūrinių variantų (linijinių oligomerų), pasižyminčių prailgintu gyvavimu kraujo plazmoje aprašymo patentinėje ir nepatentinėje literatūroje nėra rasta.

Kaip seka iš pateikto technikos lygio aprašymo, egzistuojančių baltyminių preparatų terapinis poveikis dažnai yra trumpalaikis ir reikalauja papildomų baltymo porcijų, nes organizme cirkuliuojantys baltymai greitai yra degraduojami ir netenka savo terapinio poveikio.

- Ankstesni būdai prailginti baltyminės molekulės veikimo laiką, didinant jų molekulinę masę siūlo prijungti prie terapinio baltymo molekulės nebaltymines sekas (pvz. polietilenglikolį) arba kitus baltymus (pvz. albuminą), neturinčius terapinio poveikio, tačiau tai dažniausiai

žymiai sumažina terapinės molekulės aktyvumą. Todėl aktualu būtų surasti būdą prailginti terapinį poveikį, oligomerizuojant to paties terapinio baltymo molekules. Tai leistų ne tik padidinti baltymo molekulinę masę (kas, matyt, yra vienas iš svarbių veiksnių didinant jo stabilumą *in vivo*), bet ir išlaikyti arba pagerinti biologinį naujos struktūros baltymo aktyvumą, lyginant su anksčiau žinomais, t.y. baltymo terapinio poveikio prailginimo tikslai reikalauja sukonstruoti ir išgryninti tokį aktyvų baltymą, kuris, išlikdamas stabilus *in vivo* ilgesnį laiką turėtų struktūrą, išlaikančią terapinio baltymo biologinį aktyvumą.

Tokiu būdu, šio išradimo tikslas yra sukonstruoti naujas polipeptidų struktūras antros kartos terapinės paskirties baltymams, tokiems kaip G-CSF, su jų kryptingai *in vivo* reguliuojama (prailginta) gyvavimo trukme ir biologiniu aktyvumu, genetiškai formuojant norimo ilgio homomultimerines baltymo formas, ir sukurti jų pagrindu biofarmacinius preparatus su prailginta cirkuliacijos *in vivo* trukme.

Konkrečiau, vienas iš šio išradimo uždavinių buvo sukurti efektyvią linijinio G-CSF dimero struktūrą, leidžiančią gauti biologiškai aktyvų baltymą, kurio gyvavimo *in vivo* trukmė yra didesnė nei monomerinio baltymo.

Išradimo esmė

Minėti tikslai pasiekiami, realizuojant siūlomo išradimo apibrėžties 1-5 punktų visumą.

Šis išradimas apima linijinius oligomerinius rekombinantinius baltymus, sudarytus iš to paties baltymo genetiškai sujungtų monomerų, kur monomeras yra granulocitus stimuliuojantis baltymas, ir monomerai sujungti linkerine amino rūgščių seka.

Optimaliame šio išradimo variante granulocitus stimuliuojantis baltymas yra granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius G-CSF ir monomerų skaičius yra du. Optimali linkerinė seka pagal siūlomą išradimą yra pasirinkta iš amino rūgščių sekų grupės, susidedančios iš $(S-G_4)_n$, kur $n=2-7$ ir $SGLEA-(EAAAK)_m$ - $ALEA-(EAAAK)_m$ - $ALEGS$, kur $m=2-8$.

Šis išradimas apima linijinius oligomerinius baltymus, pasižyminčius biologiniu aktyvumu bei prailgintu cirkuliacijos laiku *in vivo*.

Kitas šio išradimo objektas yra farmacinė kompozicija, apimanti veiksmingą kiekį aukščiau minėto linijinio oligomerinio baltymo, optimaliai linijinio G-CSF dimero, ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį ir/arba pagalbines medžiagas.

Brėžinių aprašymas

Fig. 1 pavaizduota dimerinio G-CSF analizė *Western blot* metodu, panaudojant monokloninius antikūnus prieš G-CSF. Linkerių sekos atskleistos toliau 1 lentelėje.

Takeliai:

1, 5 - 1 μ g monomerinio G-CSF redukuotomis sąlygomis, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;

2, 6 - 1 µg dimerinio G-CSF baltymo su linkeriu Lα, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;

3, 7 - 1 µg dimerinio G-CSF baltymo su linkeriu L5, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;

5 4, 8 - 1 µg dimerinio G-CSF baltymo su linkeriu L7, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;

K - molekulinės masės standartai (Fermentas #SM671), nuo gelio apačios: 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100 kDa.

Fig. 2 pavaizduota dimerinio G-CSF-L5 atvirkščių fazių aukšto slėgio efektyvi chromatografija (RP-HPLC), naudojant C4 (Hi-Pore RP-304, 250x4.6 mm, 300 Å, "Bio-Rad", JAV) atvirkščių fazių kolonėlę. Eliuavimui naudoti tirpalai A (0.1% trifluoracto rūgšties (TFA) vandeninis tirpalas) ir B (TFA-vanduo-acetonitrilas 0.1:9.9:90), komponentų koncentracija tirpaluose išreikšta tūrio procentais. Baltymų smailės detektuojamos esant 215 nm. Baltymo smailė buvo identifikuota pagal sulaikymo laiką t_R , o šios baltymo formos kiekis tiriamame pavyzdyje nustatytas, suintegravus chromatogramos duomenis.

Fig. 3 pavaizduotas dimerinio G-CSF baltymo koncentracijos kitimas žiurkių kraujo serume po baltymų injekcijos (500µg/kg) po oda. A – dGCSF-L5 ir kontrolinis Neupogen™ mėginys; B - dGCSF-L5, dGCSF-L7 dGCSF-Lα, kontrolinis Neupogen™ mėginys ir buferis (placebo, be baltymų), naudotas dimerinių baltymų saugojimui.

20 Fig.4 pavaizduotas dimerinių G-CSF baltymų poveikis *in vivo* pagal kraujo neutrofilų skaičiaus kitimą po baltymo injekcijos (500µg/kg) žiurkėms po oda. Kontroliniai mėginiai Neupogen™ ir buferis (placebo, be baltymų), naudotas dimerinių baltymų saugojimui.

Detalus išradimo aprašymas

25 Pagrindinis šio išradimo objektas yra linijiniai oligomeriniai rekombinantiniai baltymai, kurių pavyzdžiais yra penkios naujos linijinio dimerinio G-CSF struktūros, kurios rodo ilgesnius gyvavimo *in vivo* (serume) laikus bei panašų arba aukštesnį biologinį aktyvumą (neutrofilų proliferaciją) lyginant su kontroliniu monomeriniu baltymu.

Šio išradimo linijinius oligomeras galima gauti, naudojant visą eilę ląstelių kolonijas stimuliuojančių citokinų, tokių kaip: G-CSF (granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius), GM-CSF (granulocitus ir makrofagus stimuliuojantis faktorius), M-CSF (makrofagus stimuliuojantis faktorius). Genetiniu būdu sukonstruoto linijinio oligomero sudėtyje gali būti tiek lyginis monomerų skaičius, tiek ir nelyginis.

Išradime taip pat aprašoma, kaip buvo gauti dimerinio baltymo dGCSF struktūriniai variantai, 35 pasižymintys biologiniu aktyvumu bei prailgintu gyvavimo serume laiku. Pagrindiniai dimerinio G-CSF (dGCSF) paruošimo ir testavimo etapai pagal šį išradimą apima tokias stadijas:

- genetinės konstrukcijos gavimas bei baltymą produkuojančio bakterinio kamieno sukonstravimas;
- baltymo biosintezė, gryninimas ir renatūracija;
- *in vitro* biologinio aktyvumo granulocitų proliferacijos testavimas;
- 5 - *in vivo* gyvavimo laiko kinetikos testavimas;
- *in vivo* biologinio poveikio (neutrofilų proliferacija) testavimas.

10 G-CSF geno linijiniai dimerai buvo sukonstruoti, polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) pagalba sujungiant dvi vieno geno kopijas per linkerinę seką į vieną DNR fragmentą, kuris buvo klonuotas į ekspresijos plazmidę pET21b ir kamieną *E. coli* BL21(DE3). Buvo gautos tokios rekombinantinių baltymų konstrukcijos: dGCSF-L2, L3, L5, L7, L α , kur dvi G-CSF molekulės yra sujungtos linkerinėmis sekomis, sudarytomis iš aminorūgščių, pateiktų lentelėje 1:

1 lentelė

15 Dimerinio G-CSF (dGCSF) linkerių sekos

Linkeris	Aminorūgščių seka	Aminorūgščių skaičius
L2	(SG ₄)-(SG ₄)-S	11
L3	(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-S	16
L5	(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-S	26
L7	(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-(SG ₄)-S	36
L α	SGLEA-(EAAAK) ₄ -ALEA-(EAAAK) ₄ -ALEGS	54

20 Visų genetinių konstrukcijų DNR sekos buvo patikrintos, nustatant pirminę nukleotidinę seką, kuri atitiko numatytą dimerinę seką, koduojančią rekombinantinius baltymus sudarytus iš linijinių būdu išdėstytų G-CSF baltymo monomerinių elementų, sujungtų tarpusavyje aukščiau pateiktais linkeriniais jungtukais (monomerus jungiančiomis sekomis). Pastarieji buvo parinkti pagal didėjantį ilgį nuo dviejų iki septynių nestruktūrizuotų SGGGG elementų (Ln), arba struktūrizuoto linkerio L α (su alfa-spiraliniais domenais). L α linkerinė amino rūgščių seka, per kurią yra sujungti linijiniai oligomerai, turi alfa-spiralinius domenų EAAAK, 25 kurių skaičius gali varijuoti nuo dviejų iki aštuonių. Tokia aminorūgščių seka buvo parinkta, norint išlaikyti specifinę linkerio struktūrą su alfa-spiraliniais elementais, kurie periodiškai pasikartoja. Tiek trumpesnės linkerinės sekos (m=2), tiek ir ilgesnės sekos (m=8) sudaro tuos pačius alfa-spiralinius elementus ir suteikia analogišką struktūrą monomerus jungiančiai sekai.

Dimerinių baltymų struktūra, kaip minėta, buvo patvirtinta keliais nepriklausomais metodais: nustatyta baltymus koduojanti geno seka (visais atvejais nustatyta seka atitiko numatytą dimerinio baltymo seką, 2 lentelė).

2 lentelė

5 Dimerinių baltymų amino rūgščių seka ir molekulinė masė

Dimerinis baltymas	Molekulinė masė kDa	Pilna aminorūgščių seka	Linkerinė seka
dGCSF-L3	38,55	MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQ GDGAALQEKLKATYKLCHPEELVLLG HSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGFLFYQGGLLQALEGISPELGPTLD TLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPAL QPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVAS HLQSFLEVSYRVLRHLAQPSGGGGG SGGGGSGGGGSTPLGPASSLPQSFL LKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYK LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPS QALQLAGCLSQHLHSGFLFYQGGLLQAL EGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQ QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRH LAQP	SGGGGGSGG GGSGGGGS
dGCSF-L5	39,12	MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQ GDGAALQEKLKATYKLCHPEELVLLG HSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGFLFYQGGLLQALEGISPELGPTLD TLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPAL QPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVAS HLQSFLEVSYRVLRHLAQPSGGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSTPL GPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGA ALQEKLKATYKLCHPEELVLLGHSLGI PWAPLSSCPSQALQLAGCLSQHLHSG FLFYQGGLLQALEGISPELGPTLDTLQD VADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQ GAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQS FLEVSYRVLRHLAQP	SGGGGGSGG GSGGGGSGG GGSGGGGS
dGCSF-L7	39,75	MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQ GDGAALQEKLKATYKLCHPEELVLLG HSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGFLFYQGGLLQALEGISPELGPTLD TLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPAL QPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVAS HLQSFLEVSYRVLRHLAQPSGGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSTPLGPASSLPQSFLKCLE QVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHPE ELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLA GCLSQHLHSGFLFYQGGLLQALEGISPE LPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELG MAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGG VLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	SGGGGGSGG GSGGGGSGG GGSGGGGS GGSGGGGS

dGCSF-L α	42,52	MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQ GDGAALQEKLCAATYKLCHPEELVLLG HSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLD TLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPAL QPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVAS HLQSFLEVSYRVLRHLAQPSGLEAEA AAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAA KEAAAKEAAAKEAAAKALEGSTPLGP ASSLPQSFLKCLEQVRKIQQDGAAL QEKLCAATYKLCHPEELVLLGHSLGIP WAPLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGLF LYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDV ADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQG AMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL EVSYRVLRHLAQ	SGLEAEAAAKE AAKEAAAKEA AAKEAEAAAA KEAAAKEAAAK EAAAKELEGS
------------------	-------	---	--

Dimerinio baltymo molekulinė masė buvo įvertinta pagal SDS-PAGE judrumą ir palyginta su apskaičiuota molekuline mase (visais atvejais dimerų molekulinės masės atitinka teorinį judrumą SDS-PAGE redukuotomis sąlygomis). Imunoblotingo rezultatai patvirtina dimerinių baltymų struktūrą, įvertinus sąveiką su G-CSF specifiniais antikūnais (Fig. 1). Dimerinių baltymų aktyvią struktūrą patvirtina specifinio biologinio aktyvumo nustatymas *in vivo* testu (Fig. 4) bei *in vitro* proliferacijos testu, naudojant pelės mieloidinės leukemijos ląstelių liniją G-NFS-60, nustatant naujai gautų baltyminių struktūrų biologinį aktyvumą (3 lentelė, 3 pavyzdys).

10 Farmacinė kompozicija linijinių oligomerinių baltymų pagal šį išradimą pagrindu gali savo sudėtyje turėti vieną arba kelis tokių komponentų:

– nešiklį, kuris gali būti polihidroksiliai alkoholiai (pvz. manitolis, sorbitolis), įvairūs monosacharidai (pvz. gliukozė), disacharidai (pvz. sacharozė);

15 – buferinę substanciją reikiamos pH reikšmės palaikymui (pvz. acetatas, fosfatas, TRIS, HEPES);

– druskų priedus kompozicijos izotoniškumui palaikyti (pvz. natrio chloridas);

– detergentą, apsaugantį nuo baltymo degradacijos skystis-oras skiriamoje riboje, (pvz. polisorbato 80, polisorbato 20, įvairūs Pluronic tipo junginiai);

20 – stabilizatorių, tokį kaip polietilenglikoliai, polivinilpirolidonai, aminorūgštys (pvz. L-metioninas, L-argininas, L-histidinas, L-glutathiono rūgštis, L-asparagino rūgštis);

– chelatuojantį agentą, tokį kaip EDTA, EGTA, IDA;

– antimikrobinį agentą (pvz. benzolo darinius, tokį kaip krezolas, benzilo alkoholis);

– SH agentą (pvz. glutathionas, cisteinas, acetilcisteinas);

– kitas tinkamas pagalbines medžiagas.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Toliau pateikiami išradimo įgyvendinimo konkretūs pavyzdžiai. Šie pavyzdžiai ne apriboja, o tik iliustruoja išradimo apimtį.

5 1 pavyzdys

Dimerinio G-CSF baltymo biosintezė

Dimerinio G-CSF producentas *E. coli* BL21 (DE3) p21 GCSF/L5/GCSF [V. Chmeliauskaitė, R. Mikšytė, V. Lukša, E. Zareckaja, G. Žvirblis, Overexpression study of human colony stimulating factors in *Escherichia coli*. 2. Overexpression of human granulocyte colony stimulating factor. *Biologija*, 1996, Nr.2, p.15-18 ir kt.] buvo auginamas 2L kolbose ir/arba fermentatoriuje (Sartorius AG, 5L darbinio tūrio fermentatorius). Terpė buvo naudojama 45,12g M9 druskos, 20g mielių ekstrakto, 80 ml 20% gliukozės, 8 ml 1M $MgSO_4$, 4 ml ampicilino 100mg/ml. Fermentatoriuje reguliuojami parametrai: temperatūra 37°C; pH 6,8 (pridedama rūgšties arba šarmo), aeracija (pO_2 25-30%; 1,0-1,3l/min, O_2 koncentracija ir maišymo intensyvumas). Atskirai buvo registruojamas kultūros optinis tankis, kuris parodo priaugintos biomasės kiekį. Tikslinio baltymo sintezė indukuojama induktoriumi IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozidas). Indukcija vykdoma su IPTG (galutinė koncentracija 100 mM) esant 1.2 o.v. optiniam tankiui. Biomasės išeiga 30,31g šlapios biomasės, t.y. 8,6 g sauso svorio iš 1 L kultūrinio skysčio.

20

2 pavyzdys

Dimerinio baltymo gryninimas renatūruojant tirpale

Dimerinio G-CSF baltymo tarpinių kūnelių išskyrimas atliktas tokiu būdu: 10 g *E. coli* biomasės homogenizuojama 100 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, esant 5 mM EDTA. [homogenizatą pridedama 0.1 g lizocimo, 0.1 ml Triton X-100, 1.0 ml 100 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) ir 0.7 ml 2-merkaptoetanolio. Homogenizatas maišomas 30 min. kambario temperatūroje, veikiamas ultragarsu ledo vonioje ir centrifuguojamas 24,500 g 25 min. Skystis nupilamas, nuosėdos du kartus plaunamos, homogenizuojant 100 ml 1 M NaCl, 0.1% Tween 80 tirpale ir vieną kartą – 100 ml distiliuoto vandens. Po kiekvieno homogenizavimo gauta suspensija buvo centrifuguojama 25 min. esant 24500 g.

Dimerinio G-CSF oksidacinės renatūracijos iš tarpinių kūnelių tirpale metodika: 1.7 g dimerinio G-CSF tarpinių kūnelių tirpinama 80 ml 7 M guanidino hidrochlorido (GuHCl) tirpale 10 mM Tris-HCl buferyje, pH 7.0, maišant per naktį 4°C temperatūroje. Tarpinių kūnelių tirpalas centrifuguojamas 40,000 g 25 min. Supernatantas praskiedžiamas 10 mM Tris-HCl buferiu (pH 7.0) iki 1 mg/ml baltymo koncentracijos (pagal Bradfordą), 6 M GuHCl, pridedama $CuSO_4$ tirpalo iki 20 μM koncentracijos ir maišoma 1 val. kambario temperatūroje. Po to įpilama EDTA tirpalo iki 10 mM koncentracijos ir HCl tirpalu privedamas pH iki 5.4.

Baltymo tirpalas centrifuguojamas 25 min. esant 40,000 g. Apie 145 ml baltymo tirpalo užnešama į C 26/100 kolonėlę (2.6 × 100 cm, „Pharmacia“, Uppsala, Švedija), užpildytą 500 ml sorbento Sephadex G-25 Medium ir nupusiausvyrintą 25 mM Tris-maleino rūgšties-NaOH buferiu, pH 6.5, 0.25 M Na₂SO₄. Baltymo užnešimas ir eliuavimas 25 mM Tris-maleino rūgšties -NaOH buferiu, pH 6.5, 0.25 M Na₂SO₄, atliekamas esant 30 cm/val. tėkmės greičiui. Tikslinį baltymą turinčios eliuato frakcijos sujungiamos ir centrifuguojamos 40,000 g 25 min. Dimerinio G-CSF tirpalas po chromatografijos per Sephadex G-25 Medium gryninamas metalų chelatinės chromatografijos metodu, panaudojant sorbentą Sepharose CL-6B su kovalentiškai prijungtu dažu Geltonu ŠA 2KT-Cu(II). C 16/20 kolonėlė (1.6 × 20 cm, „Pharmacia“, Uppsala, Švedija) užpildoma 20 ml šio sorbento ir nupusiausvyrinama 25 mM Tris-maleino rūgšties-NaOH buferiu, pH 6.5, 0.25 M Na₂SO₄. Į kolonėlę įvedama 120 ml baltymo tirpalo (koncentracija 0.30 mg/ml pagal Bradfordą), ir kolonėlė plaunama 5 tūriais pradinio buferio. Baltymas desorbuojamas, laipsniškai didinant imidazolo koncentraciją kolonėlėje nuo 0 iki 300 mM. Chromatografijos metu eliuento tėkmės greitis buvo 45 cm/val. Frakcijos iš imidazolo gradiento, turinčios daugiausia tikslinio baltymo, apjungiamos ir dializuojamos prieš 25 mM Na-acetatinį buferį, pH 5.4, 4°C temperatūroje. Dimerinis G-CSF toliau grynintas jonų mainų chromatografijos metodu. 31 ml baltymo tirpalo (koncentracija pagal Bradfordą 0.13 mg/ml) įvedama į C 10/10 kolonėlę (1.0 × 10 cm, „Pharmacia“, Uppsala, Švedija), užpildytą 4 ml sorbento SP-Sepharose ir nupusiausvyrintą 25 mM Na-acetatinį buferiu, pH 5.4. Kolonėlė praplaunama 5 tūriais šio buferio, ir baltymas desorbuojamas laipsniškai didinant NaCl koncentraciją nuo 0 iki 500 mM. Chromatografijos metu eliuento tėkmės greitis 45 cm/val. Tikslinio baltymo frakcijos sujungiamos ir dializuojamos 4°C temperatūroje prieš 10 mM Na-acetatinį buferį, pH 4.0. Baltymo tirpalas po dializės centrifuguojamas ir filtruojamas per 0.22 μm sterilų filtrą. Chromatografijos metu buvo stebimas eliuato optinis tankis ties 280 nm, panaudojant detektorius UV-1 („Pharmacia“, Uppsala, Švedija). Baltymo koncentracija eliuato frakcijose nustatyta Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Identifikaciniu testu naudojamas *Western blot* metodas, panaudojant monokloninius antikūnus prieš G-CSF (Fig.1). Išgryninto baltymo kokybė tikrinama atvirkščių fazijų aukšto slėgio efektyvios chromatografijos metodu (RP-HPLC) (Fig.2).

3 pavyzdys

dGCSF biologinio aktyvumo nustatymas, naudojant jautrios ląstelių linijos proliferacijos testą

Rekombinantinio dimerinio G-CSF baltymo biologinis aktyvumas nustatomas, naudojant pelės mieloidinės leukemijos liniją G-NFS-60 [Weinstein Y, Ihle JN, Lavu S, Reddy EP, Truncation of the *c-myb* gene by retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, vol. 83, p. 5010-5014]. Aktyvus G-CSF

baltymas skatina šios ląstelių linijos proliferaciją po sąveikos su G-CSF receptoriumi ant šių ląstelių paviršiaus. Dimerinio G-CSF biologinio aktyvumo nustatymui ląstelės G-NFS-60 kultivuojamos 96 šulinėlių plokštelėse 48-72 val., pridėjus į augimo terpę skirtingus kiekius (0,1-10 ng/ml) tiriamojo GCSF baltymo pavyzdžio. Kontrolei naudojamas G-CSF vaistas

5 Neupogen™ (veiklioji medžiaga Filgrastim), kurio biologinis aktyvumas yra žinomas. Ląstelių proliferacija įvertinama kolorimetriniu metodu, naudojant MTS dažą. Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas G-CSF biologiniam aktyvumui. Dimerinio G-CSF baltymo biologinio aktyvumo duomenys pateikti 3 lentelėje.

10 Gauti rezultatai leidžia teigti, kad naudojant išradime pateikiamas baltymo struktūras bei gryninimo metodikas gaunamas biologiškai aktyvus dimerinis G-CSF baltymas.

3 lentelė

Dimerinio GCSF (dGCSF) pavyzdžių biologinis aktyvumas

Nr.	Preparatas	Biologinis aktyvumas	
		TV/ml	TV/mg
1.	dGCSF L3	$3,7 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^7$
2.	dGCSF-L5	$21,7 \cdot 10^6$	$1,57 \cdot 10^7$
3.	dGCSF-L7	$10,8 \cdot 10^6$	$2,16 \cdot 10^7$
4.	dGCSF-L α	$7,05 \cdot 10^6$	$3,064 \cdot 10^7$

15 4 pavyzdys

Farmakokinetinis dGCSF kiekio kraujo serume tyrimas

Farmakokinetiniam rekombinantinių baltymų vertinimui eksperimentiniai gyvūnai (*Wistar* žiurkės) buvo suskirstyti į grupes, kiekvienoje iš jų buvo po 4-5 žiurkės. Tiriamieji ir kontroliniai baltymai buvo sušvirkšti po oda. Naudotos tokios tiriamojo rekombinantinio baltymo kiekis skaičiuojant gyvūno kūno svoriui: nuo 100 iki 1100 μ g/kg. Kontrolei naudotas

20 preparatas Neupogen™ (Filgrastim) tomis pačiomis baltymo koncentracijomis, skaičiuojant gyvūno kūno svoriui. Rekombinantinio baltymo koncentracijos testavimui kraujo serumas iš gyvūnų buvo rinktas po 3, 6, 12 ir 18 valandų po poveikio tiriamaisiais ar kontroliniais baltymais. Tuo tikslu iš žiurkės uodegos venos buvo paimta apie 0,8-1,0 ml kraujo, kuris 1 –

25 1,5 val. inkubuotas kambario temperatūroje, po to 12 val. – šaldytuve (+4°C). Serumo atskyrimui mėginiai buvo centrifuguoti 15 min. 1500 aps./min. kambario temperatūroje, iš kiekvieno mėgintuvėlio serumas surinktas į 2-3 sterilius mėgintuvėlius ir užšaldytas šaldiklyje (-80°C). Kraujo serumas buvo testuotas pagal gamintojo instrukciją naudojant R&D kompanijos žmogaus G-CSF baltymo nustatymo rinkinius DuoSet, skirtus kraujo serumo

30 analizei ELISA metodu. Rezultatai yra pateikti Fig. 3.

5 pavyzdys

Farmakokinetinis dGCSF biologinio poveikio tyrimas

Farmakokinetiniam rekombinantinių baltymų vertinimui eksperimentiniai gyvūnai (*Wistar* žiurkės) buvo suskirstyti į grupes, kiekvienoje iš jų buvo po 4-5 žiurkes. Tiriamieji ir kontroliniai baltymai buvo sušvirkšti po oda. Naudotos tokios tiriamojo rekombinantinio baltymo kiekis skaičiuojant gyvūno kūno svoriui: nuo 100 iki 1100 µg/kg. Kontrolei naudotas preparatas NeupogenTM (Filgrastim) tomis pačiomis baltymo koncentracijomis skaičiuojant gyvūno kūno svoriui. Rekombinantinio baltymo koncentracijos testavimui kraujo serumas iš gyvūnų buvo rinktas po 24, 48, 72, 96 valandų po poveikio tiriamaisiais ar kontroliniais baltymais. Buvo atlikti gyvūnų kraujo tyrimai, panaudojant kraujo analizatorių Hemavet 950. Buvo stebimas farmakodinaminis rekombinantinių baltymų poveikis analizuojant kraujo neutrofilų (granulocitų) skaičiaus pokyčius prieš ir po rekombinantinio baltymo injekcijos. Tam iš žiurkės uodegos venos buvo paimta po 20 µl kraujo, kuris sumaišytas su 5 µl 7,5 % EDTA, inkubuota 10 min. ir analizuota minėtu aparatu. Rezultatai yra pateikti Fig. 4, iš kurių darome išvadą, kad dimerinio baltymo poveikis (neutrofilų skaičiaus padidėjimas) viršija kontrolinį. Iš pateiktų pavyzdžių darytina išvadą, kad testuotos dimerinio GCSF baltymo struktūros turi biologinį aktyvumą *in vitro* ir *in vivo* panašų arba didesnę nei kontrolinis monomerinis G-CSF baltymas (NeupogenTM), be to naujos G-CSF baltymo formos pasižymi vertingomis farmakokinetinėmis savybėmis, tokiomis kaip prailgintu gyvavimo laiku eksperimentinių gyvūnų kraujyje, lyginant su kontroliniu monomeriniu G-CSF baltymu (NeupogenTM). Naujų terapinių baltymų farmakokinetinis profilis ženkliai skiriasi nuo kontrolės: dimerinio baltymo gyvavimas kraujo serume padidėja mažiausiai šešiomis val. (Fig.3) lyginant su kontroliniu monomeriniu baltymu, be to biologinis dimerinių baltymų poveikis didinant neutrofilų skaičių tęsiasi iki 72 val., kai kontrolinio preparato veikimas pastebimas iki 48 val. po injekcijos (Fig.4).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Linijiniai oligomeriniai rekombinantiniai baltymai, sudaryti iš to paties baltymo genetiškai sujungtų monomerų, kur monomeras yra granulocitus stimuliuojantis baltymas, ir monomerai
5 sujungti linkerine aminorūgščių seka.
2. Linijiniai oligomeriniai baltymai pagal 1 punktą, kur granulocitus stimuliuojantis baltymas yra granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius G-CSF ir monomerų skaičius yra du.
- 10 3. Linijiniai oligomeriniai baltymai pagal 1 arba 2 punktą, kur linkerinė seka yra pasirinkta iš aminorūgščių sekų grupės, susidedančios iš $(S-G_4)_n-S$, kur $n=2-7$ ir $SGLEA-(EAAAK)_m - ALEA-(EAAAK)_m -ALEGS$, kur $m=2-8$.
- 15 4. Linijiniai oligomeriniai baltymai pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, pasižymintys prailgintu gyvavimo laiku *in vivo*.
5. Farmacinė kompozicija, apimanti veiksmingą kiekį linijinio oligomerinio baltymo pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, optimaliai linijinio G-CSF dimero, ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį ir/arba pagalbines medžiagas.

20

25

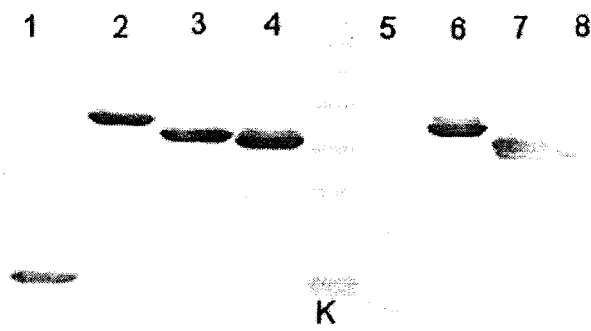


Fig. 1

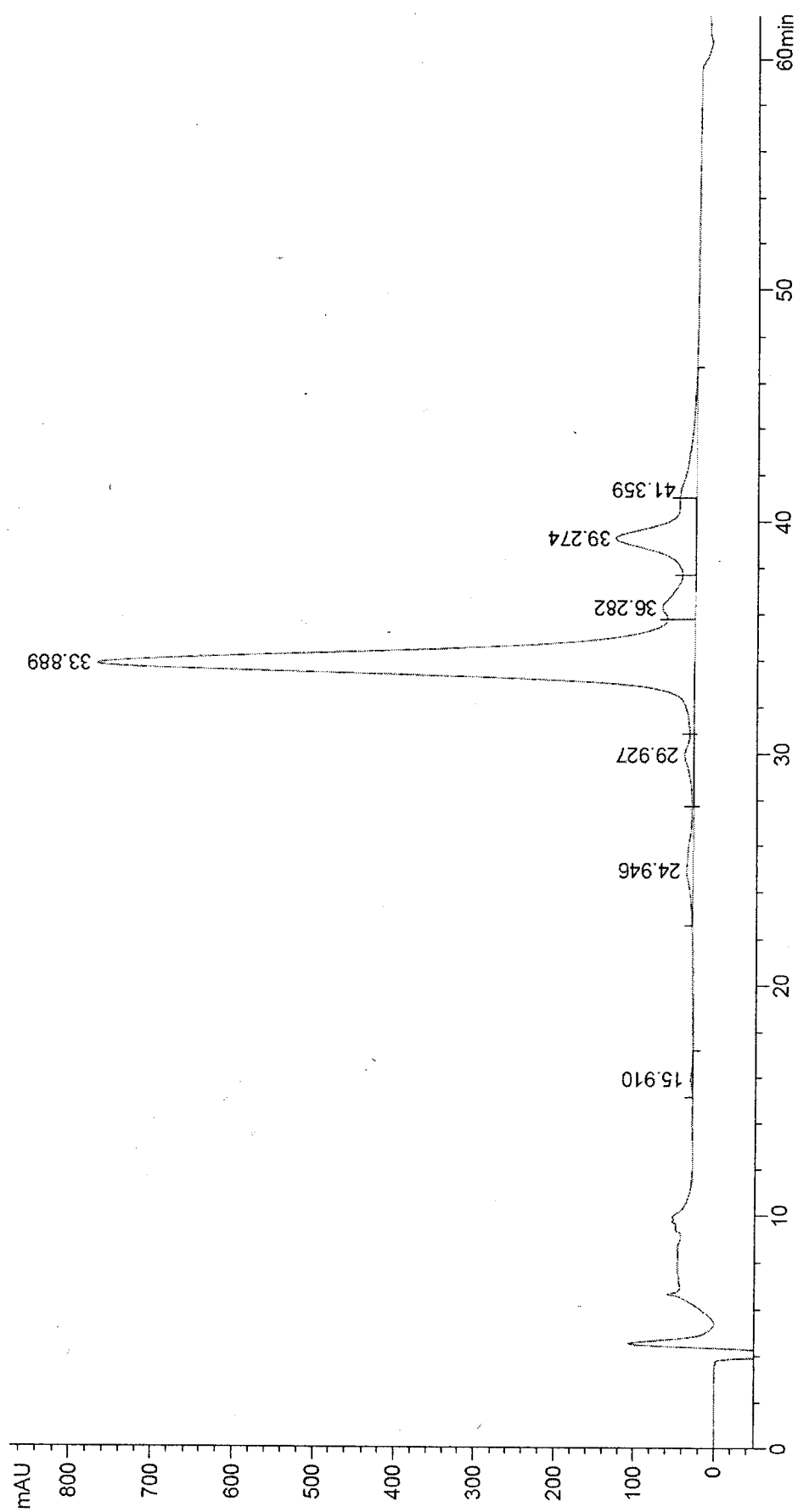


Fig. 2

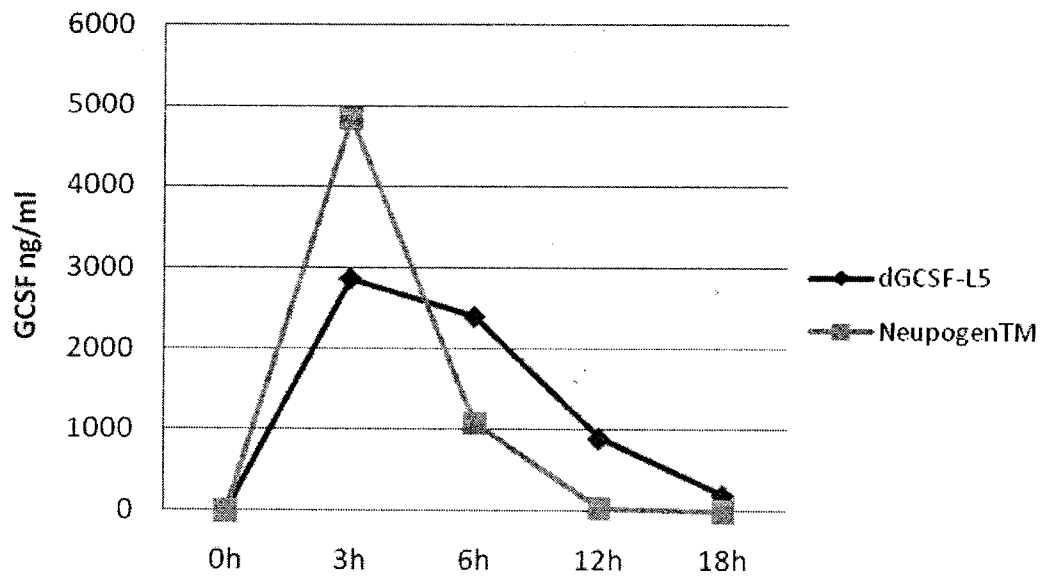


Fig. 3a

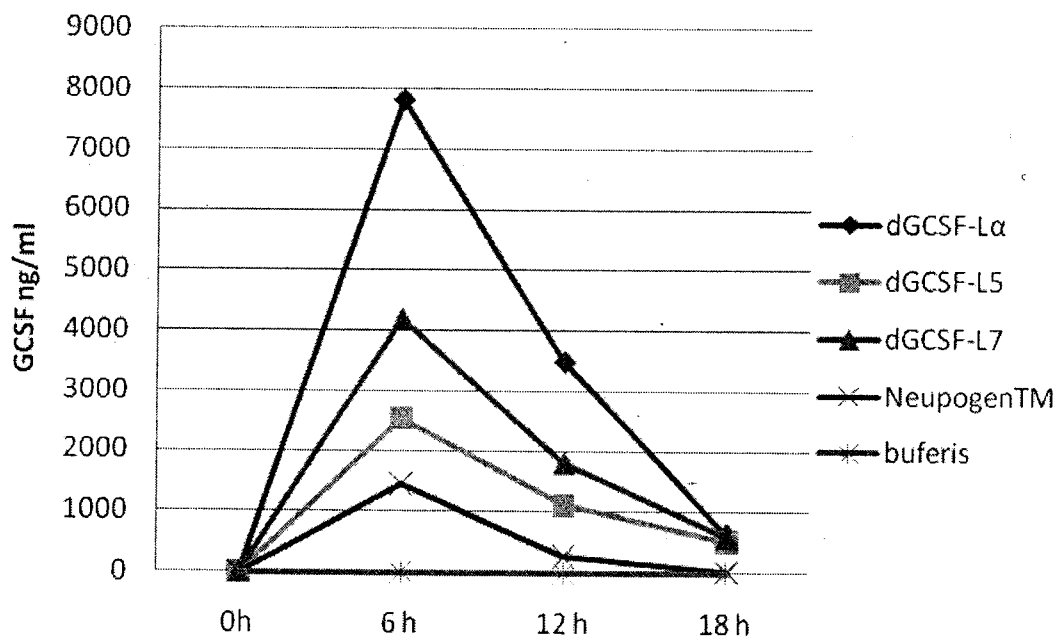
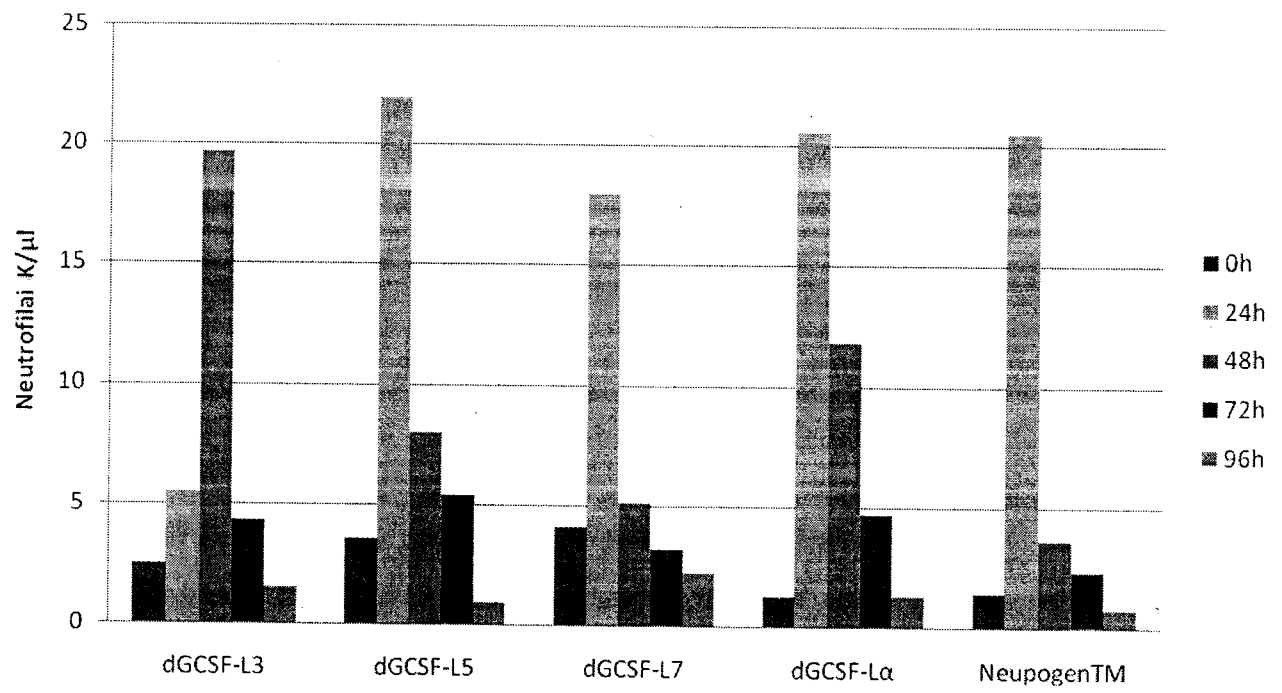


Fig. 3b

**Fig. 4**