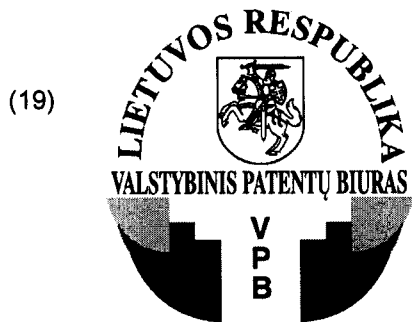




(10) **LT 2010 013 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2010 013**

(51) Int. Cl. (2006): **C07K 1/00**
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:

Biologiškai aktyvių granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus darinių
išskyrimo ir gryninimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas apibūdina naują dimerinio G-CSF gryninimo schemą, kuri pagrįsta baltymo oksidacine reantūracija tirpale arba ant metalų chelatinės kolonėlės ir tolimesniu chromatografiniu gryninimu, pvz., naudojant jonų mainų kolonėles. Sukurta gryninimo schema leidžia gauti grynus G-CSF dimerus, kurių biologinis aktyvumas tinkamas naudoti farmaciniais tikslais.

BIOLOGIŠKAI AKTYVIŲ GRANULIOCIŲ KOLONIJAS STIMULIUOJANČIO FAKTORIAUS DARINIŲ IŠSKYRIMO IR GRYNINIMO BŪDAS

5

Išradimo sritis

Šis išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai. Jo esmė – naujas gryninimo būdas, skirtas išgryninti biologiškai aktyvų granulocitų kolonijas stimuliuojančio baltymo darinį, tokį kaip linijinis granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (G-CSF) dimeras.

- 10 Siūlomas procesas yra tinkamas naudoti chimerinio G-CSF baltymo gryninimui tiek laboratoriniu, tiek ir pramoniniu mastu. Išgryninto baltymo kokybė ir aktyvumas leidžia jį panaudoti kaip prailginto veikimo farmacinių preparatų veikliąją medžiagą.

Išradimo technikos lygis

- 15 G-CSF priklauso kolonijas stimuliuojančių faktorių grupei, kuri reguliuoja homeopoetinių ląstelių prekursorių diferenciaciją ir proliferaciją bei pasižymi neutrofilų aktyvacija. G-CSF naudojamas onkologijoje ir hematologijoje. Medicinoje naudojami dviejų tipų G-CSF preparatai: nemodifikuotas G-CSF baltymas ir baltymas, sujungtas su įvairiais dariniais, tam kad prailginti baltymo veikimo organizme trukmę. Patentinėje bei mokslinėje literatūroje yra
- 20 žinoma įvairių G-CSF bei modifikuotų jo variantų išskyrimo metodų. Iš G-CSF baltymo išskyrimą ir/ar gryninimą aprašančių patentų ar patentinių paraiškų yra paminėti EP 0169566 (B2 1986), EP 0237545 (B2 1987), EP 0215126 (B1 1987), EP 0243153 (A2 1987), US 5055555 (A 1991), WO 03/051922 (A1, 2003) ir WO 0104154 (A1 2001). Literatūroje taip pat aprašomos įvairios šių baltymų gryninimo schemos, apimančios
- 25 renatūracijos ir chromatografinės gryninimo stadijas (Lu, H.S. Protein Expr. Purif 4, 465-472 (1993), Kang, S.H. ir kt., Biotechnol. Lett 17, 687-692 (1995), Yamasaki, M ir kt, Biosci Biotechnol Biochem 62, 1528-1534 (1998), Bae, C.S. ir kt., Biotechnol. Bioeng. 57, 600-609 (1998). Aprašomuose darbuose paprastai pirminės stadijos yra susijusios su ląstelės šeimininkės suardymu ir priklauso nuo baltymo ekspresinės sistemos – bakterijų, mielių ar
- 30 žinduolių kultūrų. Ekspresuojant baltymą labiausiai paplitusiose *E.coli* bakterijose, jose, kaip taisykle, G-CSF baltymas gaunamas netirpių tarpinių kūnelių pavidalu. Tokiu atveju ypatingas dėmesys skiriamas tarpinių kūnelių ištirpinimui bei baltymo renatūracijos procesui, siekiant gauti teisingai susisukusią ir biologiškai aktyvią baltymo formą. Įprastinėse gryninimo schemose tarpiniai kūneliai paprastai plaunami su detergentu ar chaotropiniu agentu, tirpdomi stipriu denatūruojančiu agentu (pvz. guanidino hidrochloridu, karbamidu)
- 35 arba tirpalu, turinčiu didelę detergento koncentraciją. Baltymo renatūracija dažniausiai

atliekama praskiedžiant baltyminių tirpalą arba jį dializuojant prieš neutralų buferį. Toliau seka gryninimas chromatografiniais metodais, dažnai naudojant jonų mainų, hidrofobines ir/arba gelfiltracinę kolonėles. Tačiau numatyti konkretaus baltymo optimalią gryninimo schemą nėra paprasta.

5

Patentinėje literatūroje aprašomi įvairūs gryninimo aspektai. Dažniausiai gryninimo schemos yra daugiapakopės, apimančios keletą chromatografijos stadijų, todėl gaunami nemaži tikslinio baltymo praradimai, kituose nepakanka duomenų apie galutinio produkto tinkamumą farmaciniam naudojimui.

- 10 Patentai EP 0347041 (A2 1989) ir EP0719860 (A1 1996) aprašo baltymo G-CSF išskyrimą iš mikroorganizmų, ląsteles lizuojant bei atskiriant netirpią baltyminę ląstelės frakciją nuo tirpių ląstelės komponentų.

Patente US 5,849,883 (A 1998) pateikiama žmogaus bei jaučio G-CSF išskyrimo iš mikroorganizmų schema. Šiame procese ląstelės lizuojamos, atskiriama netirpi baltymų frakciją, ekstrahuojama deoksiholatu, G-CSF tirpinamas ir renatūruojamas. Denatūruojančiu tirpinančiu agentu naudojamas joninis detergentas Sarkosyl, o oksidacinė denatūracija atliekama, dalyvaujant CuSO_4 . Denatūrantą pašalinimui naudojamas sorbentas Dowex. Pašalinus denatūrantą, baltymas gryninamas jonų mainų chromatografijos būdu.

15

Patentinė paraiška WO 9853072 (A1 1998) aprašo žmogaus G-CSF gamybos schemą, klonuojant G-CSF geną rekombinantinėje pYHM-G-CSF plazmidėje bei ekspresuojant baltymą *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterijose. Tikslinio baltymo ekspresijos lygis siekia iki 1.7g G-CSF iš 1L kultūrinio skysčio. Netirpus G-CSF baltymas atskiriamas nuo tirpių ląstelės komponentų ir tirpinamas karbamide. Tikslinis baltymas gryninamas naudojant sorbentus DEAE-Sepharose CL 6B ir Sephacryl S-200 HR. Gautas rekombinantinis G-CSF baltymas yra biologiškai aktyvus.

20

25

Patente EP 1837346 (A2 2007) arba WO 2007/101882 pateikiama rekombinantinio G-CSF, turinčio papildoma N-galinę metionino liekaną, ekspresija *E.coli* ląstelėse, baltymo biosintezė ir gryninimas. Pateikiamas procesas susideda iš sekančių pagrindinių gryninimo etapų: mikroorganizmų lizavimas, netirpių ląstelės baltymų, turinčių G-CSF baltymą, atskyrimas nuo tirpios frakcijos, G-CSF tirpinimas buferiniame tirpale, turinčiame chaotropinę medžiagą, oksidavimas esant oksidaciniam/redukciniam agentui (glutathione sistema), renatūracija, chaotropo pašalinimas gelfiltracinėje kolonėlėje (Sephadex G-25) ir dviejų stadijų chromatografinis gryninimas, naudojant DEAE-Sepharose ir SP-Sepharose sorbentus.

30

35

Žinomas baltymo G-CSF gryninimo procesas, aprašomas publikacijoje WO 03/051922 (A1 2003), apima imobilizuotų metalų afininę chromatografiją (IMAC) ir leidžia atskirti teisingai

susisukusią ir aktyvią monomerinio G-CSF molekulę nuo neteisingos konformacijos neaktyvių monomerinių, dimerinių ir agreguotų G-CSF baltymo molekulių. Proceso privalumas, kad IMAC atliekama natyviomis sąlygomis. Papildomas gryninimas susideda iš dviejų kolonėlių – jonų mainų bei gelfiltracijos, kurios naudojamos pašalinti proceso
 5 priemaišų likučius. Autoriai IMAC metalų prijungimui naudoja chelatuojančius agentus - iminodiacetata, nitrilotriacto rūgštį ir karboksimetilaspartatą, taip pat divalenčių metalų - Zn, Cu, Co ir Ni jonus. Aprašytame procese naudojama iki trijų chromatografinių stadijų, tačiau nėra pakankamai aiškos stadijų, ypač IMAC, išeigos; o tikslinio baltymo nuostoliai daugiapakopio gryninimo metu neoptimaliomis sąlygomis gali būti žymūs.

10

Publikuoti patentai susiję su aktyvaus monomerinio G-CSF arba jo chemiškai modifikuotų darinių gryninimu. Šiuo metu literatūroje randama įvairių baltymo molekulės modifikavimo būdų – pegilinimas, papildomas glikozilinimas, G-CSF suliejimas su feritinu. Baltymo molekulė paprastai modifikuojama tam, kad prailginti jos gyvavimo laiką kraujo serume.

15

Tačiau padidinus baltymo molekulinę masę, iškyla technologinė problema, nes tokį baltymo darinį žymiai sudėtingiau išgryninti iki farmaciniam preparatui keliamų reikalavimų. Padidėjus molekulinei masei visada didesnė baltymo agregacijos rizika, ypač modifikavus genetiškai ir ekspresuojant baltymą netirpiame būvyje (intarpiniuose kūneliuose). Todėl dažniausiai nėra galimybės vadovautis atitinkamo baltymo monomero išskyrimo ir gryninimo schemomis ir
 20 ypatingas dėmesys skirtinas ne tik kiekvienos stadijos sąlygų parinkimui, bet ir visų etapų suderinamumui, užtikrinant padidintos molekulinės masės baltymo aukštą biologinį aktyvumą gryninimo proceso pabaigoje.

20

Šiai dienai literatūroje nėra rasta jokių publikacijų, aprašančių genetiškai sukonstruoto dimerinio G-CSF baltymo išskyrimą ir išgryninimą pademonstruojant jo biologinį aktyvumą. Dimeriniai G-CSF baltymai yra linkę agreguotis tirpale, o ypač agreguojasi netaisyklingai susisukusios dimerinio G-CSF baltymo formos renaturacijos stadijoje. Todėl žinomos G-CSF gryninimo schemos nėra tinkamos dimerinio baltymo gryninimui, kadangi gaunamos itin mažos išeigos, baltymo grynumas nesiekia 80% pagal RP-HPLC, ir galima gauti biologiškai
 25 neaktyvų baltymą.

25

Todėl išradimo uždavinys ir buvo sukurti efektyvų linijinio dimero gryninimo procesą, leidžiantį gauti gryną ir biologiškai aktyvų G-CSF dimerą.

30

Išradimo esmė

35

Išradimo tikslas pasiekiamas, realizuojant apibrėžties 1-9 punktų visumą.

Pagrindinis šio išradimo objektas - naujas G-CSF baltymo darinio - genetiškai sujungto

linijinio G-CSF dimero išskyrimo ir išgryninimo procesas, užtikrinantis tokios chimerinės baltymo formos biologinį aktyvumą.

Siūlomas G-CSF baltymo darinių išskyrimo ir gryninimo būdas apima:

- a) producento mikroorganizmų lizavimą ir netirpios tikslinių baltymų frakcijos atskyrimą,
- 5 b) netirpios baltymų frakcijos tirpinimą su chaotropiniu agentu ;
- c) tikslinio baltymo renatūraciją;
- d) chromatografinį gryninimą.

Siūlomas būdas skiriasi tuo, kad renatūracija yra oksidacine tikslinio baltymo renatūracija iš intarpinių kūnelių su metalo jonais tirpale arba imobilizuotais ant chromatografinės kolonėlės, o chromatografinis gryninimas apima pagrindinį gryninimą metalų chelatine chromatografija ir papildomą gryninimą, taikant bent vieną iš jonų mainų chromatografijos ir gelfiltracinės chromatografijos arba jų kombinaciją.

G-CSF baltymo darinys pagal šį išradimą yra linijinis dimerinis G-CSF baltymas, susidedantis iš dviejų genetiškai sujungtų G-CSF baltymo monomerų, kurie sujungti linkerine seka, pasirinktą iš aminorūgščių sekų grupės, susidedančios iš:

$(\text{ser-gly-gly-gly-gly})_n$ –ser, kur n yra sveikas skaičius nuo 2 iki 7, ir
 ser gly leu glu ala -(glu ala ala ala ala lys) $_m$ -ala leu glu ala- (glu ala ala ala ala lys) $_m$ –
 ala leu glu gly ser, kur m yra sveikas skaičius nuo 2 iki 8, optimaliai m yra 4.

Netirpių dimerinių G-CSF baltymų tirpinimui naudojamas chaotropinis agentas yra guanidino hidrochlorido tirpalas buferyje, kurio pH yra ribose nuo 7,0 iki 7,15-7,2, ir oksidacinė renatūracija atliekama su metalų jonais, pasirinktais iš grupės, apimančios Cu (II), Ni (II), Zn (II), Co (II), Cd (II), Mn (II), Fe (III), optimaliai Cu (II) arba Ni (II).

Dimerinio G-CSF baltymo tirpalą po oksidacinės renatūracijos grynina metalų chelatine chromatografija su sorbentu, kurio ligandas geba koordinuotis su metalais, pasirinktais iš grupės, susidedančios iš Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , optimaliai Cu^{2+} arba Ni^{2+} , kur minėtas sorbentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš Sepharose CL-6B IDA, Chelating Sepharose Fast Flow, Ni-NTA Agarose, Sepharose CL-6B-Geltonas ŠA 2KT, optimaliai yra Sepharose CL-6B IDA arba Sepharose CL-6B-Geltonas ŠA 2KT.

Viename optimaliame išradimo įgyvendinimo variante dimerinio G-CSF baltymo oksidacinę renatūraciją vykdo tirpale, turinčiame 6-7 M guanidino hidrochlorido, esant Cu^{2+} jonams, optimaliai esant CuSO_4 0,9 – 1,5 mg/ml bendro baltymo koncentracijai ir pH ribose nuo 7,0 iki 7,15-7,2, ir metalo chelatinę chromatografiją vykdo su sorbentu su kovalentiškai prijungtu dažu, optimaliai su Sepharose CL-6B Geltonu ŠA 2KT- Cu^{2+} .

Kitame optimaliame išradimo įgyvendinimo variante dimerinio G-CSF baltymo renatūraciją vykdo kolonėlėje su sorbentu Sepharose CL-6B IDA, turinčiu chelatuotų Ni^{2+} jonų.

Abiem atvejais pageidautina atlikti papildomą gryninimą jonų mainų chromatografija, pavyzdžiui, ant sorbento SP-Sepharose Fast Flow, ir dializę, ir po to, jei reikalinga, filtruoti per endotoksinus pašalinančius filtrus.

- Kitas šio išradimo objektas yra dimerinis G-CSF baltymas, išskirtas ir išgrynintas išradime siūlomu būdu, kurio grynumas yra ne mažesnis nei 90% pagal RP-HPLC arba 95% pagal SDS-PAGE ir biologinis aktyvumas ne mažesnis nei $1,57 \cdot 10^{-7}$ TV/mg. Gautas dimerinis G-CSF baltymas pasižymi tuo, kad yra tinkamas naudoti farmaciniais tikslais.

Detalus išradimo aprašymas

- 10 Linijiniame G-CSF dimere pagal išradimą baltymo molekulės tarpusavyje sujungtos linkeriu, susidedančiu iš aminorūgščių:

(ser-gly-gly-gly-gly)_n –ser, kur n yra pasikartojančių sekų skaičius nuo 2 iki 7 (sutrumpintas linkerio sekos pavadinimas Ln) arba

- ser gly leu glu ala -(glu ala ala ala ala lys)₄ -ala leu glu ala- (glu ala ala ala ala lys)₄ – ala leu glu gly ser (sutrumpintai seka Lα).

- Šis išradimas apima naują tokiam dimeriniam baltymui tinkamą oksidacinę renatūraciją, panaudojant metalo jonus. Taip pat pirmą kartą pademonstruotas sorbento su imobilizuotu dažu taikymas dimerinio G-CSF gryninimui. Parinkus optimalias sąlygas naujoje aprašomoje gryninimo schemoje tapo galima selektyviai atskirti G-CSF dimero molekulę biologiškai aktyvioje formoje tiek nuo agreguotų, tiek nuo neaktyvių baltymo formų, dimerinį baltymą išgryninant iki farmaciniam preparatui keliamų reikalavimų.

Pagrindinės dimerinio G-CSF gryninimo proceso stadijos, leidžiančios išskirti ir išgryninti dimerinį G-CSF baltymą iš G-CSF produkujančių mikroorganizmų, yra šios:

- a) mikroorganizmų lizavimas ir netirpių baltymų frakcijos, turinčios tikslinį baltymą - linijinį dimerinį G-CSF, atskyrimas nuo tirpios ląstelių baltymų frakcijos;
- b) baltymo G-CSF dimero tirpinimas iš netirpios baltymų frakcijos;
- c) baltymo dimero oksidacinė renatūracija;
- d) pagrindinis ir papildomas G-CSF dimero chromatografinis gryninimas, įskaitant, pavyzdžiui, jonų mainų chromatografiją.

Išradime naudojamos du gryninimo schemas variantai, kurių pagrindinis skirtumas yra renatūracijos stadija, t.y. c) stadija. Vienu atveju unikali dimerui oksidacinė renatūracija vykdoma tirpale, kitu atveju - ant chromatografinės kolonėlės. Pirmi du etapai yra bendri abiem atvejais, pagrindinis chromatografinis gryninimas yra analogiškas.

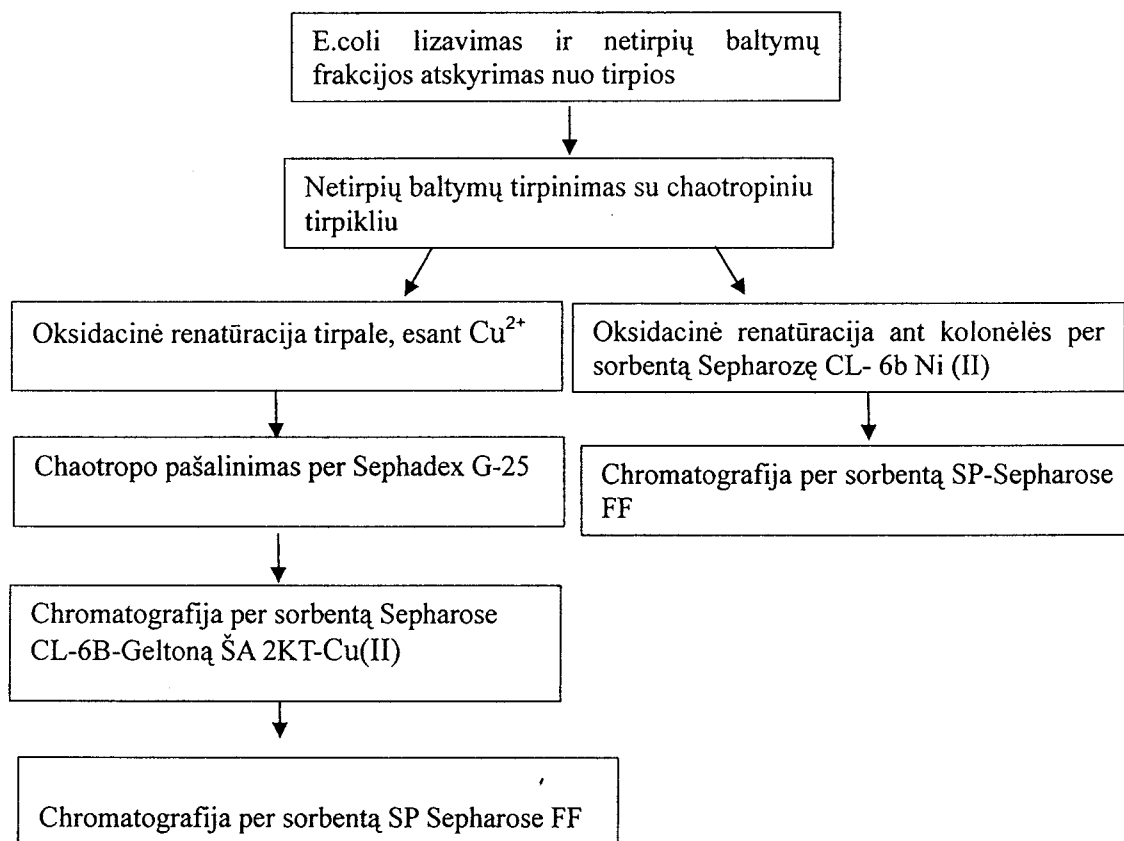
- 35 Pasirodė, kad abu sukurti tikslinio baltymo renatūracijos metodo variantai gerai tinka gauti biologiškai aktyvų dimero baltymą. Vienas variantas paremtas baltymo oksidacine

renatūracija tirpale su Cu^{2+} jonais, kitame renatūracija vyksta baltyminio tirpalo chromatografijos ant metalų chelatinės kolonėlės metu. Tolimesnis gryninimas pirmuoju atveju atliekamas panaudojant metalų chelatinę ir jonų mainų chromatografiją, antruoju atveju - jonų mainų chromatografiją.

5

Schematinis gryninimo procesas pagal šį išradimą gali būti pavaizduotas taip:

10



Dimerinio G-CSF producentu buvo naudojama E. coli BL21 (DE3) p21 GCSF/L5/GCSF sistema [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.], o induktoriumi – izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozidas (IPTG).

Intarpinių kūnelių išskyrimui biomasė buvo homogenizuojama lizavimo buferyje, maišoma, ardoma ultragarsu. Suspensija centrifuguojama po kiekvieno homogenizavimo.

Gauti intarpiniai kūneliai tirpinami buferyje su chaotropiniu agentu. Optimalūs denatūruojantys chaotropiniai agentai pasirenkami iš guanidino hidrochlorido ir karbamido,

naudojant koncentracijas 6-7M arba 7-8M, atitinkamai. Intarpinių kūnelių ardymui gali būti naudojami taip pat paviršiaus aktyvios medžiagos, kurių koncentracija tirpale yra denatūruojanti baltymo molekulės, pavyzdžiui ~1-2% detergentas Sarcosyl, Triton X-100, natrio dodecilsulfatazė ir kiti.

- 5 Oksidacinė renatūracija tirpale: gautas ištirpinus intarpinius kūnelius tirpalas centrifuguojamas, supernatantas praskiedžiamas buferiu, pridedama pereinamųjų metalų druskos, optimaliai sulfato. Be Cu (II) ir Ni (II) tinkami taip pat Zn (II), Co (II), Cd (II), Mn (II), Fe (III) sulfatai. Optimaliai pridedama, pavyzdžiui, CuSO_4 iki 0.020 mM (0,9-1,5 mg/ml bendro baltymo koncentracijos). Chaotropinis agentas pašalinamas gelfiltracija, pvz.,
 - 10 Sephadex G-25 Medium kolonėlėje.
- Metalo chelatinės chromatografijos stadija šiuo atveju vykdo su sorbentais Sepharose CL-6B Geltonas ŠA 2KT-, Blue Sepharose CL-6B, HiTrap® Affinity, arba sorbentu, kurio ligandu yra antrachinoniniai arba aromatiniai azo dažai, gebantys koordinuoti su minėtų pereinamųjų metalų jonais; optimaliai, su sorbentu Sepharose CL-6B su kovalentiškai prijungtu dažu
- 15 Geltonas ŠA 2KT-Cu(II) .
- Renatūracija, vykdoma kolonėlėje metalo chelatinės chromatografijos metu ir tolimesnė jonų mainų chromatografijos stadija, yra šiek tiek paprastesnis būdas, nei oksidacinė renatūracija tirpale. Atšildyta biomasė taip pat užpilama lizavimo buferiu, homogenizuojama, ardoma ultragarsu, cetrifuguojama. Netirpi biomasės lizato frakcija (intarpiniai kūneliai)
- 20 tirpinama buferyje su chaotropiniu agentu. Gautas supernatantas skiedžiamas ir įnešamas į kolonėlę su sorbentu, kurio ligandas gali koordinuoti su pereinamųjų metalų jonais. Optimaliai šiuo atveju metalų chelatinė chromatografija gali būti atlikta su sorbentais Sepharose CL-6B IDA, Chelating Sepharose Fast Flow, Ni-NTA Agarose ir kt., geriausiai su sorbentu Sepharose CL-6B IDA, turinčiu chelatuotų Ni^{2+} jonų.
- 25 Papildoma jonų mainų chromatografija atliekama ant sorbento SP Sepharose FF; gali būti naudojami įvairūs katijonų mainų sorbentai, tokie kaip SP Sepharose HP, CM Sepharose FF, Mono S, Toyperl SP, Toyperl CM, Ceramic HyperD F, Ceramic HyperD 20 ir kiti. Desorbuoto baltymo frakcijos koncentruojamos, dializuojamos ir, jei reikia, preparatas filtruojamas per filtrus, pašalinančius endotoksinus.
- 30 Abiem atvejais gautas biologiškai aktyvus linijinis G-CSF dimeras, kurio grynumas įvertintas elektroforetiniu (SDS-PAGE) bei atvirkščių fazių aukšto slėgio chromatografiniais (RP-HPLC) metodais. Identifikacija atlikta *Western blot* metodu, panaudojant monokloninius antikūnus prieš G-CSF. Biologiniam aktyvumui įvertinti naudotas jautrios ląstelių linijos proliferacijos testas. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad naudojant gryninimo būdą pagal šį išradimą
 - 35 gaunamas biologiškai aktyvus dimerinis G-CSF baltymas.

Brėžinių aprašymas

Pagrindiniams išradimo aspektams iliustruoti pateikiami brėžiniai:

Fig. 1 pavaizduotas dimerinio G-CSF pavyzdžių SDS elektroforezė po chromatografinio baltymo gryninimo panaudojant sorbentą SP-Sepharose Fast Flow. M- molekulinės masės standartai. Elektroforezė atlikta:

Takeliai:

- 1- 4 µg dimerinio G-CSF baltymo prieš SP-Sepharose Fast Flow chromatografiją;
- 2- 10 µg baltymo desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės
- 3- 10 µg baltymo toliau desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės;
- 4- 8 µg baltymo desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės.

Fig. 2 pavaizduota dimerinio G-CSF pavyzdžių SDS elektroforezė po chromatografinio baltymo gryninimo panaudojant sorbentą SP-Sepharose Fast Flow. M - molekulinės masės standartai (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 kDa).

Takeliai:

- 1.5 baltymo desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės frakcijos;
- 6 - pradinė frakcija iš Ni-IDA -Sepharose užpildytos kolonėlės.

Fig. 3 pavaizduotas dimerinio G-CSF atvirkščių fazių aukšto slėgio (arba aukšto efektyvumo) skysčių chromatografija (RP-HPLC), naudojant C4 (Hi-Pore RP-304, 250 x 4.6 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. 4 pavaizduotas dimerinio G-CSF analizė *Western blot* metodu, panaudojant monokloninius antikūnus prieš G-CSF. Takeliai:

- 1,5 - 1 µg monomerinio G-CSF redukuotomis sąlygomis, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai
- 2,6 - 1 µg dimerinio G-CSF baltymo su linkeriu L α , redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;
- 3,7 - 1 µg dimerinio G-CSF baltymo su linkeriu L5, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;
- 4,8 - 1 µg dimerinio G-CSF baltymo su linkeriu L7, redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis, atitinkamai;

K - molekulinės masės standartai (Fermentas #SM671).

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Nauju gryninimo ir išskyrimo būdu gauto G-CSF dimero savybės bei gavimo variantai detaliau aprašomi toliau pateiktuose 1-4 pavyzdžiuose ir lentelėje, kurie iliustruoja, bet neapriboja išradimo apimtį.

5

1 pavyzdys

Biosintezės aprašymas

Dimerinio G-CSF producentas *E. coli* BL21 (DE3) p21 GCSF/L5/GCSF buvo auginamas 2L kolbose ir fermentatoriuje (Sartorius AG, 5L darbinio tūrio fermentatorius). Terpė buvo naudojama 45,12g minimalios druskos M9 [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl], 20g mielių ekstrakto, 80 ml 20% gliukozės, 8 ml 1M MgSO_4 , 4 ml ampicilino 100mg/ml. Fermentatoriuje reguliuojami parametrai: pH (rūgšties ir šarmo pridedamas kiekis), aeracija (O_2 koncentracija ir maišymo intensyvumas). Atskirai registruojamas kultūros optinis tankis, kuris parodo priaugintos biomasės kiekį. Tikslinio baltymo sintezė indukuojama induktoriu IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozidas). Indukcija vykdoma su 40 ml IPTG (100 mM) esant 1.2 O.V. optiniam tankiui.

15

Biomasės išeiga 30,31g šlapios biomasės, t.y. 8,6 g sauso svorio iš 1 L kultūrinio skysčio.

2 pavyzdys

Gryninimo proceso aprašymas renatūruojant baltymą tirpale

Dimerinio G-CSF tarpinių kūnelių išskyrimas: 10 g *E. coli* biomasės homogenizuojama 100 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, esant 5 mM EDTA. Į 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.

25

Dimerinio G-CSF oksidacinės renatūracijos iš tarpinių kūnelių tirpale metodika: 1.7 g gautų 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

35

tirpalo užnešama į C 26/100 kolonėlę (2.6 × 100 cm, „Pharmacia“, Uppsala, Švedija), užpildytą 500 ml sorbento Sephadex G-25 Medium ir nupusiusvyrintą 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

5 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) [Zaveckas, M., Lukša, V., Žvirblis, G., Chmieliauskaitė, V., Bumelis, V., and Pesliakas, H. (2003) Mutation of surface-exposed histidine residues of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (Cys17Ser) impacts on interaction with chelated metal ions and refolding in aqueous two-phase systems. J. Chromatogr. B 786:17-32]. C 16/20 kolonėlė (1.6 × 20 cm, „Pharmacia“, Uppsala, Švedija) užpildoma 20 ml šio sorbento ir nupusiusvyrinama 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 GCSF 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 nupusiusvyrintą 25 mM Na-acetatinio 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 detektorių UV-1 („Pharmacia“, Uppsala, Švedija). Baltymo koncentracija eliuato frakcijose nustatyta Bradfordo metodu (Bradford, 1976). Fig. 1 pateikiama dimerinio G-CSF pavyzdžių SDS elektroforezė po chromatografinio baltymo gryninimo panaudojant sorbentą SP-Sepharose Fast Flow. M- molekulinės masės standartai. Elektroforezė atlikta:

Takeliai:

4 μg dimerinio G-CSF baltymo prieš SP-Sepharose Fast Flow chromatografiją;
10 μg baltymo desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės;

10 µg baltymo toliau desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės;

8 µg baltymo desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės.

Analogiški rezultatai gaunami, tarpinių kūnelių tirpinimo stadijoje naudojant 6M GuHCl ir esant pH 7,15.

5

3 pavyzdys

Gryninimo proceso aprašymas renatūruojant baltymą kolonėlėje

Dimerinio G-CSF baltymo renatūracijos ant metalo chelatinio sorbento metodika yra kiek paprastesnė, nei pirmasis oksidacinės renatūracijos tirpale metodas. Vienam gryninimo ciklui imta apie 9 g atšildytos biomasės, kuri po fermentacijos buvo laikoma -70°C temperatūroje. Užpilama 100 ml lizavimo buferio (100mM Tris/HCl, pH 8.5, 1% Triton X-100, 5mM EDTA, PMSF 1mM, 0,1M β-merkaptetanolio, 1mg/ml lizocimo), homogenizuojama, paliekama maišyti 1 val. +4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu 5 min. su pertraukomis ledo vonelėje, centrifuguojama. Nuosėdos praplaunamos du kartus po 50 ml buferiu: 1M NaCl, 0,1% Tween-80, po to 100ml H₂O. Nucentrifugavus suspensiją, netirpi biomasės lizato frakcija (tarpiniai kūneliai) tirpinama 12 ml buferyje 7M GuHCl, 25mM Tris/HCl pH 7,2 per naktį.

Nucentrifugavus tirpalas (supernatantas) skiedžiamas iki 3M guanidino hidrochlorido (GuHCl) ir įnešamas į kolonėlę, užkrautą sorbentu CL-6b IDA Sepharose su Ni²⁺ (20ml). Kolonėlė atplaunama išėjiniu buferiu. Po to kolonėlė plaunama guanidino hidrochlorido gradientu nuo 3M iki 0.

Dimerinio G-CSF baltymo desorbicija vykdoma imidazolo gradientu nuo 0 iki 0,15M išėjiniame buferyje. Elektroforetiniai SDS PAGE duomenys patvirtino, kad metalo jonų chelatinė chromatografija gerai tinka GCSF dimerinės formos gryninimui, nors neredukuotomis sąlygomis pastebimos agreguotos arba neteisingai susisukusio baltymo formos, kurias reikia pašalinti papildomos chromatografinės stadijos pagalba.

Jonų mainų chromatografija atliekama ant sorbento SP-Sepharose FF. Naudojama kolonėlė 9x40mm, elucijos greitis 30ml/val, nulygsvarinus su 20mM NaAc buferiu, pH 5,4. Baltymas desorbuojamas acetatiniu buferiu su NaCl gradientu (0 – 0,25 M, gradiento tūris 40ml). Dimerinis GCSF baltymas desorbuojasi 0,15 M NaCl koncentracijoje. Apjungtos frakcijos sukonzentruotos ir dializuotos prieš formulavimo buferį: 10mM acto rūgštis pristata iki pH 4,0 (su NaOH), 5% sorbitolio, 0,004% TWEEN 80. Preparatas steriliai filtruotas per Mustang (PALL) filtrus, pašalinančius endotoksinus.

Naudojant šią metodiką yra didesni rekombinantinio baltymo nuostoliai, susiję su tiksline baltymo agregacijos procesais metalo chelatinės chromatografijos metu bei koncentruojant ir

35

keičiant buferio pH. Fig. 2 pateikiama dimerinio G-CSF pavyzdžių SDS elektroforezė po chromatografinio baltymo gryninimo, panaudojant sorbentą SP-Sepharose Fast Flow.

M- molekulinės masės standartai (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 kDa).

Takeliai:

- 5 1-6 baltymo desorbuoto iš SP-Sepharose Fast Flow kolonėlės frakcijos;
6 pradinė frakcija iš Ni-IDA -Sepharose užpildytos kolonėlės.

Analogiški rezultatai gaunami, tarpinių kūnelių tirpinimo stadijoje naudojant 6M GuHCl ir esant pH 7,15.

- Abiem aprašytais atvejais (t.y. vykdant oksidacinę redukciją tirpale arba kolonėlėje)
10 išgryninto baltymo kokybė tikrinama atvirkščių fazių aukšto slėgio efektyvios chromatografijos metodu (RP-HPLC) (Fig.3). Identifikaciniu testu naudojamas *Western blot* metodas, panaudojant monokloninius antikūnus prieš G-CSF (Fig. 4).

4 pavyzdys

- 15 **G-CSF biologinio aktyvumo nustatymas naudojant jautrios ląstelių linijos proliferacijos testą**

Rekombinantinio dimerinio GCSF baltymo biologinis aktyvumas nustatomas, naudojant pelės mieloidinės leukemijos liniją G-NFS-60 [Weinstein Y, Ihle JN, Lavu S, Reddy EP, Truncation of the *c-myc* 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 receptoriais 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 Neupogen™, kurio biologinis aktyvumas yra žinomas. Ląstelių proliferacija įvertinama kolorimetriniu metodu, naudojant MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksietoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] dažą. Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas G-CSF biologiniam aktyvumui. Dimerinio G-CSF baltymo biologinio aktyvumo duomenys pateikti 1 lentelėje.

1 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	$7,05 \cdot 10^6$	$3,06 \cdot 10^7$

Gauti duomenys rodo, kad naujai sukurtos gryninimo schemos yra tinkamos išgryninti biologiškai aktyvų dimerinį G-CSF baltymą. Tuo pačiu gryninimo būdas leidžia gauti ne tik
5 gryną dimerinį baltymą, bet ir pakankamus jo kiekius. Todėl naujai sukurtas gryninimo būdas yra tinkamas naudoti dimerinio G-CSF baltymo gryninimui tiek laboratoriniu mastu, tiek didinti skalę iki pramoninės. Gaunamo baltymo švarumas ne mažesnis nei 95% pagal SDS-PAGE ir ne mažesnis nei 90% pagal RP-HPLC.

Baltymas, išgrynintas išradime siūlomu būdu, yra reikiamo grynumo ir kokybės, kad būtų
10 naudojamas testavimui *in vivo* su gyvūnais. Dimerinio baltymo preparatai, gauti išradime siūlomu būdu gali būti naudojami klinikiniams tyrimams, siekiant paruošti prailginto veikimo filgrastimo grupės farmacinius preparatus.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS:

1. G-CSF baltymo darinių išskyrimo ir gryninimo būdas, apimantis

- a) producento mikroorganizmų lizavimą ir netirpios tikslinių baltymų frakcijos atskyrimą,
- 5 b) netirpios baltymų frakcijos tirpinimą su chaotropiniu agentu;
- c) tikslinio baltymo renatūraciją;
- d) chromatografinį gryninimą,

10 b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad renatūracija yra oksidacinė tikslinio baltymo renatūracija iš intarpinių kūnelių su metalo jonais tirpale arba imobilizuotais ant chromatografinės kolonelės, o chromatografinis gryninimas apima pagrindinį gryninimą metalų chelatine chromatografija ir papildomą gryninimą, taikant bent vieną iš jonų mainų chromatografijos ir gelfiltracinės chromatografijos arba jų kombinaciją.

15 2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad G-CSF baltymo darinys yra linijinis dimerinis G-CSF baltymas, susidedantis iš dviejų genetiškai sujungtų G-CSF baltymo monomerų, kurie sujungti linkerine seka, pasirinktą iš aminorūgščių sekų grupės, susidedančios iš:

20 (ser-gly-gly-gly-gly)_n –ser, kur n yra sveikas skaičius nuo 2 iki 7, ir
 ser gly leu glu ala -(glu ala ala ala ala lys)_m -ala leu glu ala- (glu ala ala ala ala lys)_m –
 ala leu glu gly ser, kur m yra sveikas skaičius nuo 2 iki 8, optimaliai m yra 4.

25 3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad netirpių dimerinių G-CSF baltymų tirpinimui naudojamas chaotropinis agentas yra guanidino hidrochlorido tirpalas buferyje, pH ribose nuo 7,0 iki 7,15-7,2, ir oksidacinė renatūracija atliekama su metalų jonais, pasirinktais iš grupės, apimančios Cu (II), Ni (II), Zn (II), Co (II), Cd(II), Mn (II), Fe (III), optimaliai Cu (II) arba Ni(II).

30 4. Būdas pagal 1-3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dimerinio G-CSF baltymo tirpalas po oksidacinės renatūracijos yra gryninamas metalų chelatine chromatografija su sorbentu, kurio ligandas geba koordinuotis su metalais, pasirinktais iš grupės, susidedančios iš Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺, optimaliai Cu²⁺ arba Ni²⁺, kur minėtas sorbentas pasirinktas iš grupės, susidedančios iš Sepharose CL-6B IDA, Chelating Sepharose Fast Flow, Ni-NTA Agarose, Sepharose CL-6B-Geltonas ŠA 2KT, optimaliai yra Sepharose CL-6B IDA arba Sepharose CL-6B-Geltonas ŠA 2KT.

5. Būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, besiskiriantis tuo, kad dimerinio G-CSF baltymo oksidacinę renatūraciją vykdo tirpale, turinčiame 6-7 M guanidino hidrochlorido, esant Cu^{2+} jonams, optimaliai CuSO_4 0,9 – 1,5 mg/ml bendro baltymo koncentracijai, pH ribose nuo 7,0 iki 7,15-7,2, ir metalo chelatinę chromatografiją vykdo su sorbentu su kovalentiškai prijungtu dažu, optimaliai su Sepharose CL-6B Geltonas ŠA 2KT- Cu^{2+} .
6. Būdas pagal bet kurį iš 1-4 punktų, besiskiriantis tuo, kad dimerinio G-CSF baltymo renatūraciją vykdo kolonėlėje su sorbentu Sepharose CL-6B IDA, turinčiu chelatuotų Ni^{2+} jonų.
7. Būdas pagal 1-5 arba 1-4 ir 6 punktus, besiskiriantis tuo, kad vykdo papildomą gryninimą jonų mainų chromatografija, pavyzdžiui, ant sorbento SP-Sepharose Fast Flow, ir dializę, ir po to, jei reikalinga, filtruoja per endotoksinus pašalinančius filtrus.
8. Dimerinis G-CSF baltymas, išskirtas ir išgrynintas būdu pagal bet kurį iš 1-7 punktų, kurio grynumas yra ne mažesnis nei 90% pagal RP-HPLC arba 95% pagal SDS-PAGE ir biologinis aktyvumas ne mažesnis nei $1,57 \cdot 10^{-7}$ TV/mg.
9. Dimerinis G-CSF baltymas pagal 8 punktą, skirtas naudoti farmaciniais tikslais.

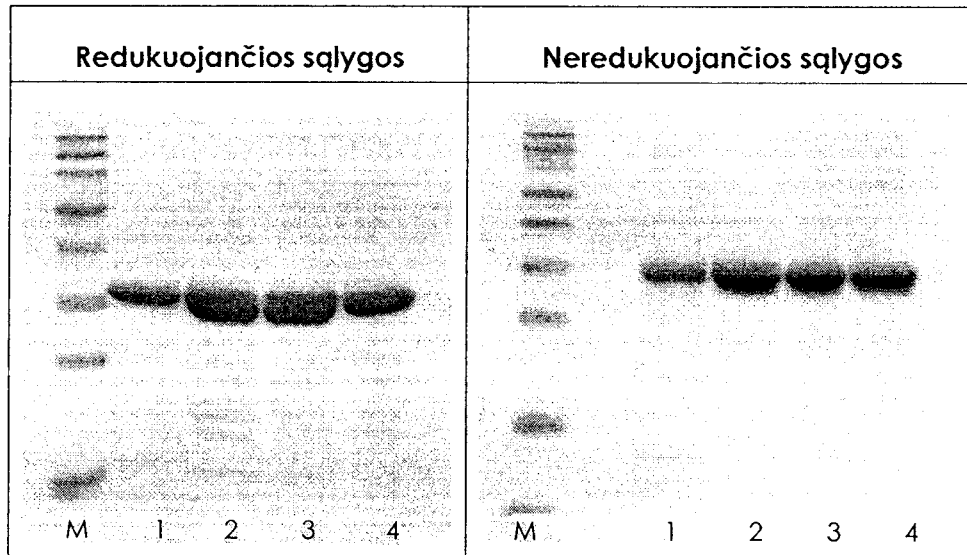


Fig. 1

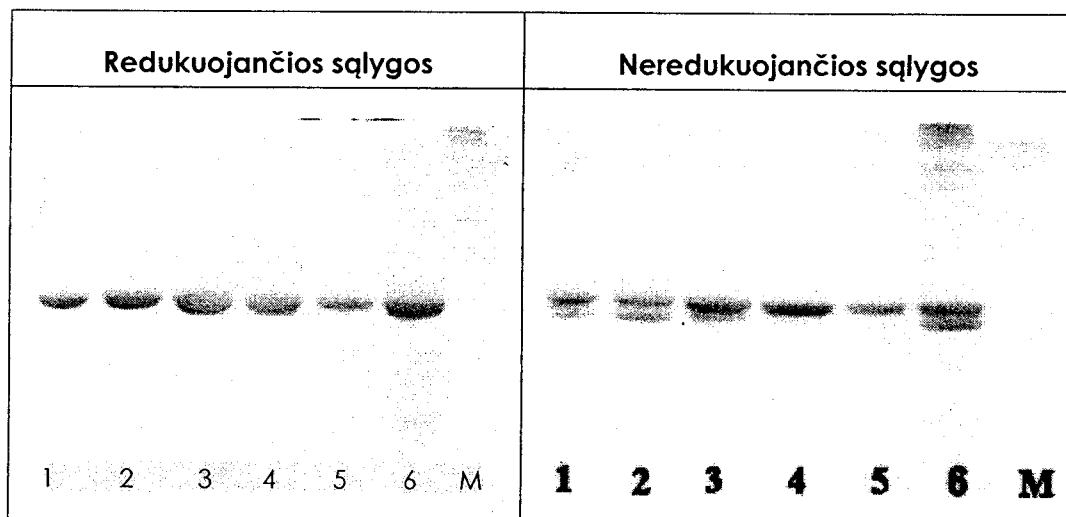


Fig. 2

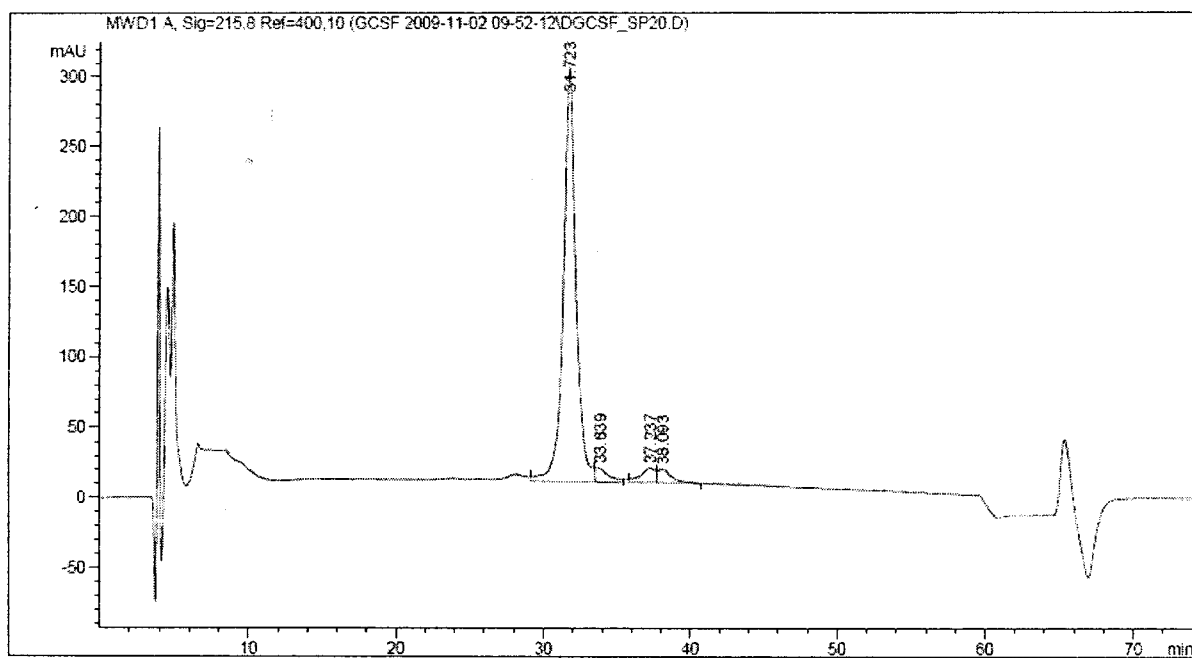


Fig. 3

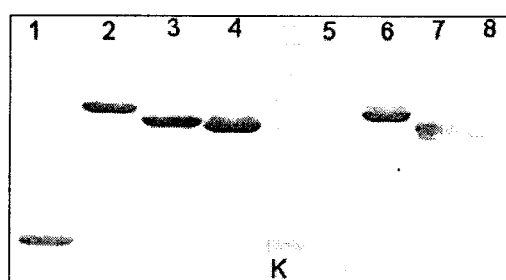


Fig. 4