

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3999**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 13/00,**
A61K 37/38

(21) Paraiškos numeris: **IP1654**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 06 25**

(60) SU duomenys: **PCT/IT 88/00048, 1988 06 24 SU 4743338, 1990 03 05**

(31,32,33) Prioritetas: **48110/87, 1987 06 26, IT**

(72) Išradėjas:

Giuseppe Arpaia, IT
Serenella Serani, IT
Antonino Sirna, IT
Stefano Villa, IT

(73) Patent savininkas:

ISTITUTO DI RICERCA CESARE SERONO S. p. A., Via Valle Caia 22 - 00040 Ardea -
Rome, IT

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Baltymas, biologiškai aktyvus hormonas, farmacinis preparatas

(57) Referatas:

Šis išradimas siūlo žmogaus folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) išvalymą nuo poklimaksinio šlapimo gonadotropino, panaudojant imunochromatografiją ir aukšto slėgio atvirkščių fazių skysčių chromatografiją. Gaunamas biologiškai aktyvus hormonas, neturintis liuteinizuojančio hormono (LH) ir kitų šlapimo baltymų priemaišų.

Šis išradimas skirtas iš šlapimo išskirtam folikulus stimuliuojančiam hormonui bei jį turinčioms vaistinėms kompozicijoms.

5 Folikulus stimuliuojantis hormonas (FSH), kaip žinoma, naudojamas gydant nevaisingumą. Šį hormoną turintys preparatai naudojami išsaugant nėštumą in vivo ir in vitro. Žmogaus FSH išskirtas iš žmogaus hipofizio ir iš poklimaksinio periodo moters šlapimo. Neseniai FSH
10 gautas panaudojant rekombinantinės DNR metodiką.

Pirmo komercinio preparato, turinčio FSH, sudėtyje buvo (pavyzdžiui, Fergonal® Serono) žmogaus menopauzės gonadotropinas (ZMG), ekstrahuotas iš poklimaksinio šlapimo.
15 Tai buvo FSH, liuteinizuojančio hormono (LH) bei kitų šlapimo baltymų mišinys. Tiek moksliniams, tiek ir terapiniams tikslams stengtasi gauti išvalytus FSH preparatus. Šiuo metu parduodamas produktas Metrodin® (Serono) yra iš šlapimo išskirtas FSH preparatas, turintis ir kitų šlapimo baltymų, tačiau LH kiekis jame minimalus, ir jis naudojamas gydant nevaisingumą. Šis produktas ypač naudotinas tais atvejais, kai nepageidautina drauge su FSH įvesti ir egzogeninį LH, pavyzdžiui, esant kiaušidžių polikistozės sindromui (KPS).
20

25 Iki šiol gydymo tikslais FSH buvo naudojamas injekcijų į raumenis pavidalu. Kadangi šias injekcijas daro gydytojai ar kiti profesionalūs medikai, ligoniams tenka lankytis reguliariai chirurgo kabinete ar ligoninėje
30 tam, kad gautų gydymą. Tai sudaro tam tikrus sunkumus. Be to, ligoniai dažnai išreiškia nepasitenkinimą ryšium su tuo, kad gydymas užsitęsia keletą savaičių ar net mėnesių ir visą tą laikotarpį reikia gaišti laiką vaistinių preparatų įvedimui.

35

Poodinės injekcijos suteiktą galimybę ligoniui pačiam susileisti vaistus ir jis pats labiau galėtų dalyvauti gydyme.

5 Žmogaus menopauzės gonadotropino (ŽMG) poodinės injekcijos jau aprašytos (Nakamura ir kt., Vaisingumas ir nevaisingumas, 46(i), p. 46-54, 1985) moters nevaisingumo gydymo metu peristaltinio poodinio siurbliuko pagalba pulsuojančiai įvedant ŽMG. Poodines injekcijas
10 gali lydėti vietinės alergijos reakcijos, sukeltos preparate esančių priemaišų, ir gali tekti nutraukti gydymą.

P. Ruz ("Žmogaus folikulus stimuliuojantis hormonas",
15 Acta Endocrinologica Supplementum, 131, 1968) aprašė ir apibūdino hipofizio ir šlapimo FSH išgrynintus preparatus, išskirtus atitinkamai iš užšaldytų hipofizių ir poklimaksinio šlapimo koncentrato. Hipofizio FSH biologinis aktyvumas buvo apie 14000 tarptautinių vienetų/1 mg, o šlapimo FSH - 780 tarptautinių vienetų/1 mg.
20 Tikimasi, kad daugumoje aktyvių hipofizio ir šlapimo preparatų LH priemaiša sudaro apytikriai 0,1% masės. Preparato valymui naudojama viena ar daugiau sekančių metodikų, kaip antai chromatografija dietilaminoetilceliuliozėje, Sefadekso G-100 gel-filtracija, hidrok-silapatitinė chromatografija, elektroforezė poliakrilamido gelyje ir pan.
25

Donini ir kt. ("Klimaksinio šlapimo FSH išvalymas ir
30 dalinis fizikocheminis ištyrimas" Gonadotropinai ir kiaušidžių vystymasis, Dviejų darbinių susitikimų medžiaga, E. ir C. Livingston, Edinburgas ir Londonas, 1970) aprašė vieną iš labiausiai išvalytų FSH preparatų, kuris turėjo 1255,6 tarptautinių vienetų/1 mg biologinį aktyvumą, o LH priemaiša sudarė iki 3,2 tarptautinių vienetų/1 mg. Šiam atvejui pradine medžiaga
35 pasitarnavo žmogaus klimaksinis gonadotropinas (ŽKG)

preparato Pergonal® pavidalu, kuris, kaip buvo nurodyta aukščiau, yra FSH, LH bei kitų šlapimo baltymų mišinys. Galutinis rezultatas buvo pasiektas periodiškai valant pradinį ŽKG dietilaminoetilceliuliozės kolonėlėje, gel-
5 filtruojant Sefadekse G-100 ir paskutinėje stadijoje panaudojant preparatyvinę poliakrilamido gelio-elekt-roforezę.

Dar didesnio efektyvumo pasiekė H. van Hell ir kt.
10 ("Žmogaus šlapimo FSH ir LH valymas ir kai kurie ypau-
tumai", Gonadotropinai, I tarptautinio simpoziumo gona-
dotropinų klausimu medžiaga, 1971, Uili, Intersaiens,
Niujorkas) prie tradicinių chromatografinio valymo me-
todų pridėjęs dar papildomas imunochromatografijos ir
15 gel-filtracijos stadijas. Imunochromatografija atlikta
panaudojant pririštus prie Sefarozės antikūnus žmogaus
chorioniniam gonadotropinui, tam, kad būtų iš dalinai
išvalyto FSH pašalintas LH. Labiausiai išvalytos FSH
frakcijos FSH aktyvumas buvo 4720 tarptautinių vie-
20 netų/1 mg, o LH aktyvumas tesudarė tik 15 tarptautinių
vienetų/1 mg, išmatuojant radioimunoanalizės būdu.

Donini ir kt. aprašė imunochromatografinį valymo būdą
("FSH ir LH išvalymas ir išskyrimas iš ŽKG", Acta
25 Endocrinologica, 52, p. 186-198, 1966), kuomet dar 1966 m.
gavo FSH preparatą, kurio aktyvumas buvo 329,7 tarp-
tautiniai vienetai/1 mg ir LH-2,4 tarptautiniai viene-
tai/1 mg. Kadangi preparato, pasižymėjusio FSH aktyvumu
329,7 tarptautiniai vienetai/1 mg, jokia radioimuno-
30 analizė nebuvo daryta, todėl galima prielaida pagal
analogiją su H. van Helo rezultatais (žr. iki pat šla-
pimo sekrecijos. Cheminė-fizinė diferenciacija parodyta
eksperimente, lyginant labai išvalytą FSH, išskirtą iš
šlapimo pagal šį išradimą, su labai išvalytu FSH pre-
35 paratu, išskirtu iš hipofizio.

Iki- ir po- transliacinės modifikacijos, matyt, ir sudaro FSH mikroheterogeniškumo pagrindą. FSH- tai glikoproteidas, sudarytas iš dviejų skirtingų glikozilintų nekovalentiškai sujungtų polipeptidinių grandinių, žinomų kaip alfa ir beta subvienetai. Beta- subvienetas sąlygoja molekulės biologinį specifiškumą.

Be visa kita, šis straipsnis bando paaiškinti esminį skirtumą, stebimą lyginant biologinį aktyvumą/mg labai išvalytų FSH, išskirtų iš šlapimo ir iš hipofizio. Galima prielaida, kad tai sąlygoja angliavandeninės dalys, o konkrečiai, sialo rūgšties galinės liekanos.

Tenka pažymėti, kad, nežiūrint to, kad tiek hipofizio FSH, tiek ir šlapimo FSH vadinami "FSH", tačiau nėra tvirto įrodymo, kad šios molekulės, išskirtos iš skirtingų dviejų šaltinių yra cheminiu požiūriu vienodos ir ekvivalentiškos.

20 **Išradimo aprašymas**

Šiuo metu žinoma, kad iš poklimaksinio šlapimo koncentrato galima išskirti labai išvalytą žmogaus šlapimo FSH, neturintį net pėdsakinių kiekių LH ar kitų šlapimo baltymų. Be to, atlikus išskirto pagal šį išradimą šlapimo FSH aminorūgščių analizę, netikėtai išaiškintas naujas FSH beta- subvienetas, susidedantis iš 111 aminorūgščių, vietoje 118 ar 108, kaip tai buvo nurodyta anksčiau (žr. pvz., Skotas ir kt. aukščiau) apibūdinant žinomą FSH beta- subvienetą. Šis išradimas siūlo naują FSH beta- subvieneto aminorūgščių seką:

10
 Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu
 20
 Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr
 30
 Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr
 40 50
 Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr
 60
 Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly
 70
 Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
 80 90
 Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser
 100
 Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys
 110
 Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

o taip pat naują baltymą, turintį naują gonadotropino
 alfa-subvienetą ir beta-subvienetą, susidedantį iš 111
 5 aukščiau išvardintų aminorūgščių. Baltymas pasižymi fo-
 likulus stimuliuojančio hormono (FSH) biologiniu akty-
 vumu. Jis dažniausiai sutinkamas glikozilintoje formo-
 je. Jo didžiausias privalumas, kad jis neturi liuteini-
 zuojančio hormono ir kitų šlapimo baltymų priemaišų
 10 pėdsakų.

Šio išradimo realizacijos kitas variantas yra farmacinė
 kompozicija, turinti pagal išradimą išvalytą baltymų ir
 farmaciniu požiūriu tinkamą užpildą. Tinkamiausia jai
 15 forma yra poodinės injekcijos. Po oda išvirkšti šie
 vaistai nesukelia alerginių reakcijų, būdingų vartojant
 žinomus FSH preparatus.

Pagal šio išradimo kitą variantą siūlomas naujo ir labai išvalyto FSH gavimo būdas. Būdas grindžiamas imunovalymo stadijos ir atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografijos kombinacija. Imunovalymo sta-

5 dijoje naudojami imobilizuoti monokloniniai antikūnai lygiai taip, kaip tai aprašyta aukščiau paminėto patento (Didžioji Britanija, Nr. 2173803A) paraiškoje, su vieninteliu esminiu skirtumu, kad FSH iš imunokomplekso eliuojamas esant aukštesnėms pH reikšmėms.

10

Pagal šiame išradime pateikiamą būdą eliucijai patogų, naudoti vandeninį tirpalą, kurio pH apytikriai 10 ir moliaringumas - apytikriai 0,5. Pateikėjų atlikti eksperimentai parodė, kad esant tokioms sąlygoms, imobi-

15 lizuoti antikūnai neinaktyvuojami. Tai prieštarauja aukščiau paminėtos patento paraiškos (Didžioji Britanija) (1 psl., 36-37 eilutės) doktrinai, skelbiančiai "Eliuentų, turinčių tokias aukštas pH reikšmes, panaudojimas praktikoje neįmanomas, kadangi tai sukelia

20 greitą antikūnų inaktyvaciją".

Šį skirtumą gali sąlygoti metodų, naudotų antikūno surišimui su polimeru, skirtumai.

25 Pagal šį išradimą eliuento geresnis pH aukščiau 11, o geriausias yra intervale nuo 11,3 iki 11,7.

Moliaringumo reikšmė geresnė daugiau 0,8 ir geriausia apie 1.

30

Pagal išradimą tinkami eliuentai yra amoniakas, dietilaminas ir tokie buferiai kaip TRIS-buferis, glicinas-NaOH ir pan.

35 Sekanti atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografijos stadija leidžia pašalinti bet kurią iš priemaišinių baltymų. Imunovalymo stadijos vienos nepakanka

tokiam išvalymui pasiekti. Tai pripažįstama ir Didžiosios Britanijos patento paraiškos tekste. Panaudota papildoma aukščiau paminėta valymo stadija ne tik efektyviai išvalo preparatą nuo priemaišų pėdsakų, bet taip pat išsaugo pilną FSH aktyvumą. Pastarasis rezultatas yra visai netikėtas P. Chalino ir S.A. Chano straipsnio šviesoje (J. Liq. Chromat., 9/13, p, 2855-2868/1986), kuriame skelbiama, kad jaučio FSH ir žmogaus FSH (ŽKG standartas) praranda biologinį aktyvumą atvirkščių fazijų skysčių chromatografijos metu. Kita vertus, tame pačiame straipsnyje parodomas patenkinamas biologinio aktyvumo atstatymas, tačiau pasiekiamas tik dalinis išvalymas, kuomet žmogaus šlapimo preparatas, turintis tiek FSH, tiek ir LH, valomas aukščiau nurodytu būdu.

Po atvirkščių fazijų aukšto slėgio skysčių chromatografijos stadijos FSH atstatomas panaudojant gradiento metodikas. Produktą galima liofilizuoti saugojimo ir/ar manipuliavimo tikslu. Produkto koncentracijai, stabilizacijai ar kitam apdorojimui numatomos kitos tam tikslui tinkamos metodikos.

Be abejo, poklimaksinis šlapimas yra žymiai prieinamesnė medžiaga negu žmogaus hipofizis. Ši aplinkybė suteikia šiam išradimui ryškų privalumą.

FSH-specifinius monokloninius antikūnus, naudojamus pagal šį išradimą gavimo būdui, galima gauti panaudojant žinomas metodikas.

Tipišku atveju hibridomos 9/14 linijos ląstelės skринinguojamos optimalaus afiniškumo FSH atžvilgiu Kembri-džo Universitete. Ląstelės kultivuojamos ir monokloniniai antikūnai produkuojami iš supernatanto terpę, iš kurios jie išskiriami panaudojant 50% amonio sulfatą (skaičiuojant svorį tūriui). Po to naudojama atvirkščių

fazių joninė chromatografija ir aukšto slėgio skysčių chromatografinė gel-filtracija ir dializė.

5 Laštelių 9/14 linijos produkuojami ir nurodytu aukščiau būdu išvalyti monokloniniai antikūnai atitinka šiuos techninius reikalavimus:

- a) baltymo švarumas ne mažiau 90%;
- 10 b) imunoglobulino klasė: IgG 1;
- c) afiniškumo konstanta: $3,5 \times 10^8 \text{ l.mol}^{-1}$
- d) specifiškumas:

15

<u>Antigenas</u>	<u>% kryžminės reakcijos</u>
FSH	100
ChGH	1
ChGH-beta-subvienetas	1
LH	1
TSH	1

e) susijungimo su FSH geba tirpale: apie 1000 tarp-tautinių vienetų FSH 1 mg MoAK.

20 FSH-specifiniai monokloniniai antikūnai chemiškai surišami su Sefaroze 4B panaudojant divinilsulfoną pagal metodą, kurį aprašė Dž. Poratas "Methods in Enzymology", 34, p. 13-30, 1974.

25 Tipiškame pavyzdyje 1 litras Sefarozės 4B praplaunamas porėtame stikliniame šviesofiltre iš pradžių 5 litrais distiliuoto vandens, o po to 5' litrais 1 M natrio karbohidrato tirpalo, pH 11. Išplauta sefarozę suspen-duojama 1 litre 1 M natrio karbonato tirpalo (pH 11).

30 Nuolat maišant, lašais pridedama 200 ml divinilsulfono.

Reakcija pabaigiama per 70 min kambario temperatūroje ir nutraukiama pridedant 1 N HCl tirpalo (pH iki 7,0).

5 Aktyvuota smala suspenduojama 1 litre 0,25 M natrio bikarbonato tirpalo (pH 9,0), turinčio 2g anti-FSH monokloninių antikūnų, gaunant didesnę negu 90% antikūnų susirišimą su aktyvuota derva. Gauta imunoderva saugoma 4°C temperatūroje.

10 1 pavyzdyje pateikiamos šio išradimo dvi valymo būdo stadijos, tinkamos komerciniam ŽKH, t.y. Pergonalo® preparato (Serono) aktyviam ingredientui.

15 Reikia suprasti, kad nors ŽKH yra geresnė išeitinė medžiaga šio išradimo būdai, tačiau visa tai tinka ir kitoms mažiau išvalytoms medžiagoms, tokioms kaip poklimaksinio šlapimo koncentratai ir panašioms. Geri rezultatai gauti naudojant kaip išeitinę medžiagą šlapimo koncentratą, turintį tik 1 tarptautinį vieneta FSH/1 mg.

20 Kiti šio išradimo variantai ir privalumai bus akivaizdūs susipažinus su sekančiais pavyzdžiais, kuriais išradimas neapsiriboja.

25 **1 pavyzdys: Labai išvalyto šlapimo FSH gavimas**

1 stadija: Imunovalymas panaudojant anti-FSH MoAK-DVS-Sefarozę.

30 ŽKH naudojamas kaip išeitinę medžiagą.

Imunoderva anti-FSH MoAK-DVS-Sefarozę inkubuojama su 0,1 M Tris-HCL, 0,3 M NaCl buferyje, pH 7,5 4°C temperatūroje. Į kolonėlę įvedamas tam tikras FSH kiekis
35 tarptautiniais vienetais (RIA), atitinkantis 80-90% bendros FSH rišančios gebos.

Laisvi baltymai eliuojami buferiu tol, kol eliuato optinis tankis ties 280 nm (OD_{280}) nebus mažiau 0,02.

5 Absorbuotas šlapimo FSH eliuojamas iš imunodervos 1 M amoniako tirpalu 4°C temperatūroje. Amoniakiniai eliuatai, atitinkantys apytikriai 4-kartinį imunodervos tūrį, yra grupuojami, pH pasiekiamas iki 9,0 kaip galima greičiau 4°C temperatūroje pridedant ledinės acto rūgšties. Po to tirpalas ultrafiltruojamas Amikon aparate
10 (membrana C.O.10000 daltonų) ir koncentruojamas iki mažo tūrio.

2 stadija. Atvirkščių fazių aukšto slėgio chromatografija

15 Gauta tirpalo pH privedamas iki 5,6, po to jis įvedamas į kolonėlę C_{18} su atvirkščiomis fazėmis (Pre Pak waters), kuri prieš tai buvo sulygsvarinta 0,05 M buferiniu amonio acetato tirpalu kambario temperatūroje.
20 Tirpiklio fronto judėjimo greitis - 100 ml/min. Eliuatas matuojamas ties 280 nm.

Valymui naudojamas aparatas Prep 500 A (Waters), turintis UV-detektorių ir preparatyvaus gradiento generatorių.
25

Biologiškai aktyvus labai išvalytas šlapimo FSH eliuojamas izopropanolio gradientu iki 50% judrios fazės. Frakcijos tikrinamos panaudojant analitinę gel-chromatografiją ir radioimunoanalizę.
30

Organinis tirpiklis pašalinamas distiliuojant vakuume 40°C temperatūroje. Po to tirpalas užšaldomas ir liofilizuojamas.
35

2 pavyzdys: FSH tyrimas

5 Pagal šią išradimą gautą labai išvalytą šlapimo FSH preparatą tiria keliais cheminiais-fiziniais, biologiniais ir imunologiniais metodais tam, kad gautų jo pilną charakteristiką. Kaip nurodyta žemiau, dauguma tyrimų atlikta lyginant su labai išvalytu FSH preparatu, išskirtu iš hipofizio, gautu pagal žemiau aprašytą metodą.

10

Išeitine medžiaga panaudotas neišvalytas žmogaus hipofizio ekstraktas, gautas kaip pašalinis produktas ekstrahuojant žmogaus augimo hormoną.

15

Metodika susideda iš sekančių stadijų:

20 1) Neišvalyto žmogaus hipofizio ekstrakto pirminis išvalymas ekstrahuojant 40% etanolium, turinčiu 6% amonio acetato, pH 5,6, precipituoiant supernatantą 96% šaltu etanolium.

25 2) Tolimesnis valymas panaudojant joninę chromatografiją dietilaminoetilceliuliozėje su 0,15 M natrio acetato tirpalu, pH 7,0 kaip eliuentu, ir po to precipituoiant 96% šaltu etanolium.

30 3) FSH frakcijos tolimesnis valymas gel-filtracijos Sefadekse S 100 būdu panaudojant kaip buferį 0,05 M amonio bikarbonatą.

35 4) FSH valymo paskutinė SP stadija panaudojant joninę chromatografiją kolonėlėje Sefadeksas S 50. Labai išvalytas hipofizio FSH eliuojamas 0,1 M fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 6,2 ir po to liofilizuojamas.

Kaip buvo nustatyta, hipofizio FSH biologinis santykinis aktyvumas in vivo (Stilmano-Rolei testas; tarp-

tautinis vienetas antrojo IRP-NMS) sudaro 4770 tarptautinių FSH vienetų 1 mg liofilizuotų miltelių. Šiam nustatymui naudota metodika, aprašyta žemiau po antrašte "Biologinio aktyvumo kiekybinis nustatymas".

5

Atliekami sekantys tyrimai:

Kontaminacija LH

10 Šis testas atliekamas panaudojant specifinę LH (liuteinizuojantis hormonas) radioimunoanalizę su LH standarto pagalba, graduoto pagal antrąją IRP-ZKH P^{125} f-LH kaip žymėtą atomą, naudojant trigubą KIT (kodas 10204), pagamintą Biodata® kompanijos. Kaip antiserumas naudotas ožkos anti-ChGH (žmogaus choriono gonadotropinas) antiserumas, kurį gavo pareiškėjas. Šis antiserumas rodė 100% kryžminę reakciją su LH ir mažiau negu 0,1% su FSH.

20 Radioimunoanalizės metodas būtinas patikrinant, ar gautas pagal 1 pavyzdį labai išvalytas šlapimo FSH nėra užterštas liuteinizuojančiu hormonu.

25 Aukščiau pateikti rezultatai patvirtinti panaudojant kitą jautresnį metodą DELFIA (disociacija-pagerinta lautamid-fluoro-imunoanalizė), kuriam įrangą pateikia firma LKB-Farmacija.

Elektroforezė poliakrilamido gelyje su natrio dodecilsulfatu

30 Blokinė elektroforezė plokščiame gelyje su natrio dodecilsulfatu vykdoma redukcinėmis sąlygomis 13,5% poliakrilamido gelyje, pH 8,8 pagal metodą, aprašytą Lemli žurnale Nature, 227, p. 680-685 (1970).

Dažoma briljantiniu Kumasi mėliu R-250, 0,25% 25% metanolio / 75% acto rūgšties.

- 5 Šiuo metodu tiriamas tiek labai išvalyto FSH preparatas, gautas kaip aprašyta aukščiau. Bandymo rezultatai parodyti Fig. 1, kur parodytos tiek šlapimo, tiek hipofizio FSH preparatų juostos drauge su molekulinės masės markeriais (M.M.).
- 10 Abiejuose FSH preparatuose pagrindinė didžioji juosta, būdinga glikoproteidams, sutinkama vienos ir tos pačios molekulinės masės, apytikriai 20000 daltonų, kas atitinka literatūrinius duomenis. Dėl žinomo glikoproteidų elgesio šios elektroforezės sąlygomis gautas dydis yra
- 15 šiek tiek didesnis nei yra iš tikrųjų.

Mainų chromatografija

- 20 Labai išvalyti FSH preparatai, išskirti iš šlapimo ir iš hipofizio, analizuojami kolonėlėje TKG 2000 SW naudojant 0,1 M buferinį fosfatinį tirpalą, pH 6,8, + 0,2 M NaCl kaip eliuentą. Tirpiklio fronto judėjimo greitis 0,7 ml/min, matuojama ties 230 nm.
- 25 Fig. 2 pateikiami duomenys, kurie rodo įprastus pagrindinius šlapimo ir hipofizio FSH pikus, kurių laikai panašūs (atitinkamai 13,37 ir 13,35 min).

Izoelektrofokusavimas

- 30 Izoelektrofokusavimas atliekamas 5% plonasluoksniame poliakrilamidiniame gelyje (Anfolin, LKB®, pH 3,5-9,5), fiksuojama 11,5% (masės) trichloracto rūgštimi ir 3,5% (masės) sulfosalicilo rūgštimi, dažoma sidabru iš BIO-RED® rinkinio.
- 35

Fig. 3 pateikti duomenys apie labai išvalytus FSH preparatus, išskirtus iš šlapimo ir hipofizio, įskaitant ir izoelektrinio taško markerius. Kaip matyti iš paveikslėlio, abu preparatai rodo keletą juostų, tačiau jų piešinys skiriasi. Šlapimo FSH pagrindinės juostos yra pH intervale mažiau kaip 4,8, kai tuo tarpu hipofizio FSH pagrindinės juostos pasireiškia aukštesniame pH intervale.

Šie bandymai rodo, kad šlapimo ir hipofizio FSH nėra identiškos molekulės ir kad jų skirtumus sąlygoja angliavandeninių, o gal ir pačių baltyminių dalių skirtumai.

15 **Biologinio aktyvumo kiekybinis nustatymas**

Labai išvalyto šlapimo FSH preparato biologinį aktyvumą in vivo nustato Stilmano- Rolej metodu (Endokrinologija, 53, p. 604-616, 1953) naudodami kaip etaloną ŽKH-Haus etaloną, graduotą pagal 2-ąją Tarptautinį Etaloninį Preparatą ŽKH, skirtą biologinio aktyvumo kiekybiniam nustatymui. Šią analizę priėmė visos pagrindinės Farmakopėjos ir Tarptautinių Vienetų nustatymo Sveikatos apsaugos Tarnybos FSH biologinio aktyvumo nustatymui.

Nustatyta, kad labai išvalytas šlapimo FSH preparatas, gautas pagal aukščiau pateiktą pavyzdį, pasižymi santykinio aktyvumu lygiu 6200 T.V. FSH/1 mg liofilizuotų miltelių, tai didžiausias kada nors aprašytas iš šlapimo išskirto FSH aktyvumas.

Aminorūgščių sekos nustatymas

a) Šlapimo FSH subvienetų išskyrimas

- 5 Šlapimo FSH subvienetai išskiriami panaudojant aukšto slėgio skysčių chromatografijos sistemą Waters, turinčią kolonėlę Akvapor RP-300, 200 x 4,6 nm, 7 μm (Braunli Lebs). Eliuentai sekantys: A=0,1% TFA (trifluoracto rūgštis, Iners), B=0,055% TFA acetonitrile.
- 10 Tirpiklio fronto judėjimo greitis - 1 ml/min prie 35°C. Pradinis režimas - 15% B. Per 20 min gradientas padidinamas 40% B. UV-detektorius dirba ties 229 nm. Įvedama analizinė serija - 20 μl 0,5 mg/ml FSH tirpalo ir 0,5% TFA. Pradinė inkubacija TFA tirpale nebūtina.
- 15 Preparatyviai išskiriama toje pačioje kolonėlėje. Gauama gera skiriamoji geba, kuomet įvedama 0,5 mg labai išvalyto žmogaus šlapimo FSH (serija Nr. 032), ištirpinto A buferyje. Frakcijos renkamos rankiniu būdu ir džiovinamos koncentratoriuje Spid Vak. Subvienetai
- 20 ištirpinami vandenyje, analizuojami aukšto slėgio skysčių chromatografija ir saugomi minus 20°C temperatūroje.

- Beta-subvienetas eliuojamas apytikriai po 10,5 min kaip
- 25 platus pikas, alfa-subvienetas eliuojamas per 15 min kaip smailus pikas. Kiekvienas pikas identifikuojamas kaip alfa- ir beta-subvienetas radioimuninės analizės būdu. Paprastai redukuojama apie 50% subvieneto, kai tuo tarpu alfa-subvieneto redukuojama daugiau kaip 90%.

30

b) Alfa- ir beta-subvienetų redukavimas ir karboksi-
metilinizavimas

- Išskirtų, kaip aprašyta a) dalyje, subvienetų-redukavimas atliekamas panaudojant 0,5% Tris; 0,1% EDTA, 6 M
- 35 guanidin-HCl, pH 8,5 2 val bėgyje 37°C temperatūroje pridėjus DTT (ditiotreitolio, Serva) 15-kartų didesniu

moliaringumu negu cisteino. Po to į reakcijos mišinį pridedama natrio jodacetato (2,1 moliaringumo negu DTT) ir paliekama 30 min tamsoje. Reakcija sustabdoma pridėjus 1% merkaptoetanolio it TFA. Karboksimetilintus subvienetus valo aukšto slėgio skysčių chromatografija. Beta-karboksimetilintas subvienetas blogai tirpsta vandenyje, todėl galutinė išeiga nereikšminga.

10 c) Beta-subvieneto redukavimas, piridiletilinimas ir poveikis tripsinu.

Išskirto kaip aprašyta a) dalyje, beta-subvieneto redukavimas atliekamas kambario temperatūroje 2 val bėgyje šiuo būdu: 0,1 mg beta-subvieneto inkubuojama su 0,5 ml 0,5 M Tris tirpalo, 0,1% EDTA, 6 M guanidin-HCL, pH 8,5, 2,7 mg ditiotreitolio. Piridiletilinama pridėjus 0,02 ml 4-vinilpiridino prie aukščiau paminėto tirpalo. Reakcija vyksta 2 val kambario temperatūroje. Pagaliau, reakcijos mišinys patalpinamas į S4-patroną (Beiker), su 0,1% TFA. Patronas praplaunamas 0,1% TFA ir piridiletilintas beta-subvienetas eliuojamas 40% acetonitrilu, 0,1% TFA. Eliuotos frakcijos džiovinamos ir valomos aukšto slėgio skysčiu chromatografija kaip tai aprašyta aukščiau. Išvalytas piridiletilintas beta-subvienetas ištirpinamas 1% NH_4HCO_3 tirpale, pH 8.

d) Alfa-subvieneto sekvenavimas

Alfa-subvieneto, karboksimetilinto alfa-subvieneto arba viso labai išvalyto šlapimo FSH sekvenavimas (aminorūgščių liekanų sekos nustatymas) atliekamas panardinant 5 nmolių ar mažiau į baltyminių sekvenserių (470 A, Eplaid Biosistem) ir panaudojant standartinę programą 03PRTH, pateiktą Eplaid Biosistem, arba specialią programą, kurioje ciklai, skaldantys P o arba Cly, pakeisti specialiu ciklu 03CPPO.

Pradedant nuo molekulės NH_2 galo identifikuojama pirmos 45 liekanos, šie rezultatai patvirtina seką, žinomą iš literatūros (J. Biol. Chem., 250, p, 6735/1975). Asn 52 padėtyje ir 78 padėtyje žinomoje sekoje prasidedančioje

5 Ala, ir yra tos aminorūgštys, kur vyksta glikozilini-

mas. NH_2 gale visada yra nevienodumas ir jis visada toks pats visuose sekvenuotuose mėginiuose. Visa mole-

kulė (t.y. prasidedanti Ala) būna 65% grandinių, mo-

lekulė, neturinti pirmųjų dviejų aminorūgščių (t.y.

10 prasidedanti Asp), pasitaiko 5% molekulių, o neturinti pirmųjų trijų aminorūgščių (t.y. prasidedanti Val) pa-

sitaiko 30% atvejų.

		1				5
65%	grandinių	Ala	Pro	Asp	Val	Glu...
5%	grandinių			Asp	Val	Glu...
30%	grandinių				Val	Glu...

15 Alfa-subvieneto nevienodumas

e) Beta-subvieneto sekvenavimas

Atliekamos kelios sekvenavimo serijos, panaudojant be-

20 ta-subvienetus, karboksimetilintus beta-subvienetus, visą labai išvalytą žmogaus šlapimo FSH ir piridil-

etilinto beta-subvieneto tripsinizuotus peptidus. Mė-

giniai panardinami į baltymų sekvenserį (470 A9 Eplaid Biosistem) ir panaudojama programa 03PPTH, pateikta

25 Eplaid Biosistem. Duomenys rodo, kad šis subvienetas turi 111 aminorūgščių ilgį ir sekančią seką:

LT 3999 B

18

10

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu
20
Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr
30
Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr
40 50
Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr
60
Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly
70
Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
80 90
Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser
100
Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys
110
Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

Asn 7 ir 24 padėtyje, pradedant nuo Asn 1 padėtyje, yra tos aminorūgštys, kur vyksta glikozilininimas.

- 5 Beta-subvieneto NH₂ gale visada yra nevienodumas, kuris vienodas visuose sekvenuotuose mėginiuose. Pilna molekulė (t.y. prasidedanti nuo Asn) pasitaiko 35% grandinių, molekulė, neturinti pirmos aminorūgšties (t.y. prasidedanti Ser) pasitaiko 15%, o molekulė, neturinti pirmųjų dviejų aminorūgščių (t.y. prasidedanti Cys) pasitaiko 50%.

1

5

35%	grandinių	Asn	Ser	Cys	Glu	Leu...
15%	grandinių		Ser	Cys	Glu	Leu...
30%	grandinių				Glu	Leu...

Beta-subvieneto nevienodumas.

3 pavyzdys: Vaistiniai preparatai

5 Farmacinių vaisto formų, turinčių labai išvalytą šlapimo FSH, gautą pagal šį išradimą, gavimas nesudaro sunkumų. Kadangi medžiaga išlaiko savo biologinį aktyvumą po liofilizacijos, pastaroji talkina gaunant formą, tinkamą injekuojamiems preparatams.

10 Liofilizuotas preparatas, turintis labai išvalytą šlapimo FSH, tirpinamas fiziologiniame tirpale ir/ar kitokiame tinkamame skiediklyje ir gaunamas švirkščiamas tirpalas.

15 Kai kurie užpildai gali būti panaudoti kompozicijoje kaip jos dalis, pavyzdžiui, manitas, laktozė, glicinas, gliukozė, sacharozė ir jų mišiniai. Galima naudoti ir kitus tradicinius užpildus ar jų mišinius.

20 Bandymuose, atliktuose pagal išradimą, švirkščiamiems preparatams kaip užpildas panaudota laktozė.

25 Gaminant injekcinius preparatus, pasirinktinai gali keisti pH iki tam tikros reikšmės, pridėdant tradicinių rūgštinių ar šarminių medžiagų. Kaip rūgštinė medžiaga gali būti naudojama acto rūgštis ir pan. Iš šarminių medžiagų naudojamas natrio šarmas ir pan. Galima naudoti mišinius.

30 Šio išradimo rėmuose galima panaudoti vieną ar daugiau stabilizatorių, pavyzdžiui, albuminą ir pan.

20000 ampulių, kurių kiekviena turi 75 tarptautinių vienetų FSH, partijos vaistų gamybos pavyzdys atrodo sekančiai:

35

Liofilizuotų FSH miltelių paskaičiuotas kiekis (biologinio aktyvumo vienetais) ištirpinamas 700 ml šalto

apirogeninio vandens, skirto injekcijoms. Jeigu reikalinga, pH pasiekiamas intervale nuo 6,2 iki 6,8 tam tikslui panaudojant acto rūgštį ar natrio šarmą. Po to tirpalas sterilinamas filtruojant per filtrą, kurio poros 0,2 μm dydžio.

200 g laktozės ištirpinama 2 litruose apirogeninio vandens, skirto injekcijoms, sterilizuoja kaip aprašyta aukščiau ir prideda prie FSH tirpalo.

10 Apirogeninis vanduo injekcijoms pridedamas tam, kad būtų pasiektas galutinis 15 litrų tūris. Po to tirpalas išpilstomas į ampules (po 0,75 ml kiekviena) ir liofilizuojama steriliame liofilizatoriuje. Gaunamos ampulės, kurių kiekviena turi po 75 tarptautinius vienetus FSH ir 10 mg laktozės.

Geresniame variante kiekviena ampulė gali turėti 150 tarptautinių vienetų FSH ir 10 mg laktozės.

20 Pagal kitą vaistinio preparato pavyzdį gaunamos ampulės, turinčios be laktozės kaip užpildo dar po 1 mg albumino kaip stabilizatoriaus.

25 Nors šis išradimas iliustruojamas specifiniais pavyzdžiais reikia suprasti, kad įvairūs variantai gali būti papildomai realizuoti šio išradimo apimties ir esmės ribose.

30

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Baltymas, turintis alfa- ir beta-subvienetus, kurio alfa-subvienetas yra gonadotropino alfa-subvienetas ir beta-subvienetas turi sekančią aminorūgščių seką:

10

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu

20

Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr

30

Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr

40

50

Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr

60

Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly

70

Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val

80

90

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser

100

Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys

110

Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

2. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi beta-subvienetą, susidedantį iš 110 aminorūgščių ir turintį jų seką, nustatytą pagal 1 punktą, tačiau be pradinio Asn (1 padėtis).

3. Baltymas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi beta-subvienetą, susidedantį iš 109 aminorūgščių ir turintį jų seką, nustatytą pagal 1 punktą, tačiau be pradinių Asn ir Ser (2 padėtis).

22

4. Baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gonadotropino alfa-subvienetas turi sekančią aminorūgščių seką:

10

Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	Thr	Leu	Gln
20												
Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Ser	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu
30												
Gln	Cys	Met	Gly	Cys	Cys	Phe	Ser	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr
40												
Pro	Ley	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	Lys	Asn
60												
Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Ala	Lys	Ser	Tyr
70												
Asn	Arg	Val	Thr	Val	Met	Gly	Gly	Phe	Lys	Val	Glu	Asn
80												
His	Thr	Ala	Cys	His	Cys	Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	His	Lys
90												
Ser	Asp	Cys	Thr	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Tyr	Cys

5

5. Baltymas pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi alfa-subvienetą, susidedantį iš 90 aminorūgščių ir turintį jų seką, nustatytą pagal 4 punktą, tačiau be pradinių Ala ir Pro (2 padėtis).

10

6. Baltymas pagal bet kurią iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi alfa-subvienetą, susidedantį iš 89 aminorūgščių ir turintį jų seką, nustatytą pagal 4 punktą, tačiau be pradinių Ala ir Pro (2 padėtis) ir Asp (3 padėtis).

15

7. Baltymas pagal bet kurią iš 1-6 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra glikozilintoje formoje.

20

8. Baltymas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad glikozilini beta-subvieneto (beta-subvienetų) Asn 7 ir 24 padėtyse ir alfa-subvieneto (alfa-subvienetų) Asn 52 ir 78 padėtyse.
- 5 9. Baltymas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pasižymi folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) aktyvumu.
- 10 10. Baltymas pagal bet kurią iš 1-6 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad neturi liuteinizuojančio hormono ir kitų šlapimo baltymų priemaišų pėdsakų.
11. Baltymas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį ekstrahuoja iš žmogaus klimaksinio šlapimo.
- 15 12. Biologiškai aktyvus iš šlapimo išskirtas folikulus stimuliuojantis hormonas, neturintis liuteinizuojančio hormono ir kitų šlapimo baltymų priemaišų pėdsakų.
- 20 13. Biologiškai aktyvus hormonas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi gonadotropino alfa-subvienetą ir beta-subvienetą, kurio aminorūgščių seka apibrėžta 1 punkte.
- 25 14. Baltymas pagal 9 ar 12 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pasižymi santykinu aktyvumu, ne mažesniu kaip 6200 tarptautinių vienetų FSH 1 mg liofilizuotų miltelių.
- 30 15. Vaistinis preparatas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi baltymo pagal bet kurią iš 1-14 punktų terapiškai efektyvų kiekį.
- 35 16. Vaistinis preparatas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi tinkamą užpildą.

17. Vaistinis preparatas pagal 16 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad užpildas yra laktozė.
- 5 18. Vaistinis preparatas pagal bet kurią iš 15-17 punk-
tų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra lio-
filizuotoje injekcijoms skirtoje formoje.
19. Vaistinis preparatas pagal bet kurią iš 15-18 punk-
tų, skirtas poodiniam išvirkštimui.
- 10 20. Vaistinis preparatas pagal 15 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad turi 75 tarptautinių vienetų
FSH ampulėje.
- 15 21. Vaistinis preparatas pagal 15 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad turi 150 tarptautinių vienetų
FSH ampulėje.
- 20 22. Vaistinis preparatas pagal bet kurią iš 15-20 punk-
tų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi žmogaus
albuminą kaip stabilizatorių.
23. Baltymo pagal bet kurią iš 1-14 punktų panaudojimas
vaistinio preparato pagal 15 punktą gamybai.
- 25

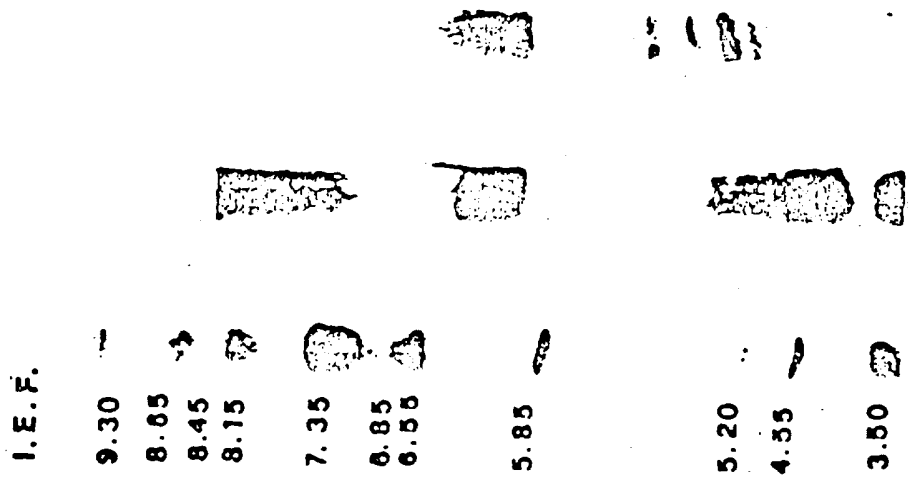


Fig.3

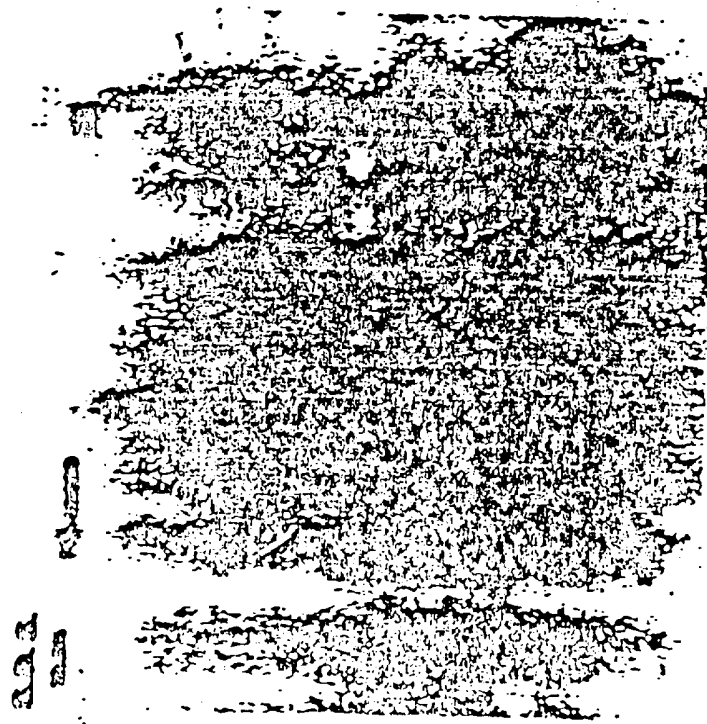
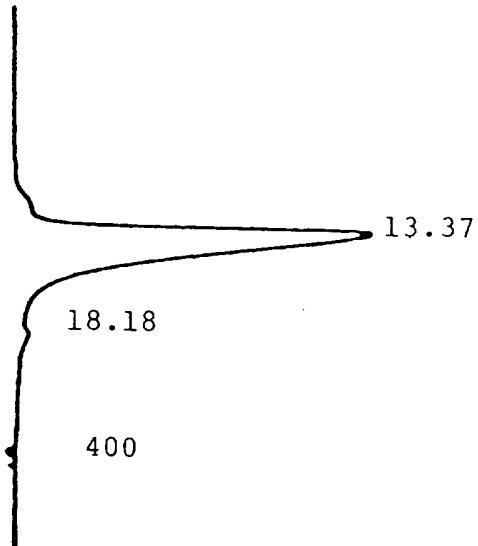


Fig.1

uFSH



pFSH

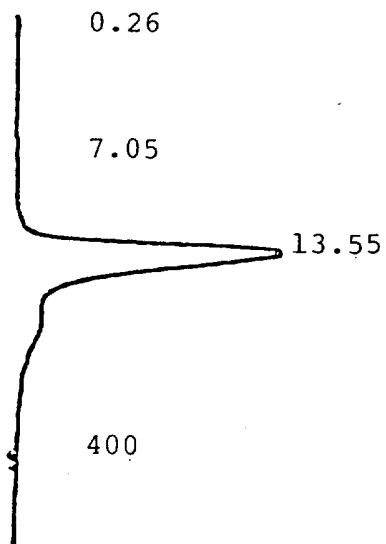


Fig.2