

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4018**

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

(21) Paraiškos numeris: **IP1652**

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

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

(45) Patent paskelbimo data: **1996 08 26**

(60) SU duomenys: **PCT/IT 88/00048, 1988 06 24 SU 4613604, 1989 02 24**

(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:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Baltymas, biologiškai aktyvus hormonas, baltymo gavimo būdas, farmacinis preparatas

(57) Referatas:

Šis išradimas siūlo žmogaus folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) išvalymą nuo poklimaksinio šlapimo gonadotropino, panaudojant imunochromatografiją ir atvirkščių fazių aukšto slėgio 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 ir jo valymo būdui.

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 rekombinantines DNR metodiką.

Pirmo komercinio preparato, turinčio FSH, sudėtyje buvo (pavyzdžiui, Fergonal® Serono) žmogaus menopauzės gonadotropinas (ŽMG), ekstrahuotas iš poklimaksinio
15 šlapimo. Tai buvo FSH, liuteinizuojančio hormono (LH) bei kitų šlapimo baltymų mišinys. Tiek moksliniams, tiek ir terapiniams tikslams stengiamasi gauti išvalytus FSH preparatus. Šiuo metu parduodamas produktas Metrodin® (Serono) yra iš šlapimo išskirtas
20 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
25 polikistozės sindromui (KPS).

Iki šiol gydymo tikslais FSH buvo naudojamas injekcijų į raumenis pavidalu. Kadangi šias injekcijas daro gydytojai ar kiti profesionalūs medikai, ligoniams
30 tenka lankytis reguliariai chirurgo kabinete ar ligoninėje 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
35 reikia gaišti laiką vaistinių preparatų įvedimui.

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
10 injekcijas 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
20 tarptautinių vienetų/1 mg, o šlapimo FSH - 780 tarptautinių vienetų / 1 mg. Tikimasi, kad daugumoje aktyvių hipofizio ir šlapimo preparatų LH priemaiša sudaro apytikriai 0,1 % masės. Preparato valymui naudojama viena ar daugiau sekančių metodikų, kaip
25 antai chromatografija dietilaminoetilceliuliozėje, Sefadekso G-100 gel-filtracija, hidroksilapatitinė chromatografija, elektroforeze poliakrilamido gelyje ir pan.

- 30 Donini ir kt. ("Klimaksinio šlapimo FSH išvalymas ir 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
35 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 pasitarnavo žmogaus klimaksinis gonadotropinas (ZKG) preparato Pergonal® pavidalu, kuris, kaip buvo nurodyta aukščiau, yra FSH, LH bei kitų šlapimo baltymų mišinys. Galutinis rezultatas buvo pasiektas

5 periodiškai valant pradinį ZKG dietilaminoetilceliuliozės kolonėlėje, gel-filtruojant Sefadekse G-100 ir paskutinėje stadijoje panaudojant preparatyvinę poliakrilamido gelioelektroforezę.

10 Dar didesnio efektyvumo pasiekė H. van Hell ir kt. ("Žmogaus šlapimo FSH ir LH valymas ir kai kurie ypatumai", Gonadotropinai, I tarptautinio simpoziumo gonadotropinų klausimu medžiaga, 1971, Uili, Intersaiens, Niujorkas) prie tradicinių

15 chromatografinio valymo metodų pridėjęs dar papildomas imunochromatografijos ir gel-filtracijos stadijas. Imunochromatografija atlikta panaudojant pririštus prie Sefarozės antikūnus žmogaus chorioniniam gonadotropinui, tam, kad būtų iš dalinai išvalyto FSH pašalintos LH. Labiausiai išvalytos FSH frakcijos FSH

20 aktyvumas buvo 4720 tarptautinių vienetų / 1 mg, o LH aktyvumas tesudarė tik 15 tarptautinių vienetų / 1 mg, išmatuojant radioimunoanalizės būdu.

25 Donini ir kt. aprašė imunochromatografinį valymo būdą ("FSH ir LH išvalymas ir išskyrimas iš ZKG", Acta Endocrinologica, 52, p.186-198, 1966), kuomet dar 1966 m. gavo FSH preparatą, kurio aktyvumas buvo 329,7 tarptautiniai vienetai / 1 mg ir LH - 2,4 tarptautiniai

30 vienetai / 1 mg. Kadangi preparato, pasižymėjusio FSH aktyvumu 329,7 tarptautiniai vienetai / 1 mg, jokia radioimunoanalizė nebuvo daryta, todėl galima prielaida pagal analogiją su H. van Helo rezultatais (žr. aukščiau), kad galbūt radioimunoanalizės (RIA) metu

35 būtų galima aptikti pėdsakinius LH kiekius.

Donini ir kt. parodė net minimalių LH priemaišų fiziologinį svarbumą ("Naujas liuteinizuojančio hormono biologinio nustatymo metodas", Acta Endocrinologica, 58, p.463-472, 1968), pasiūlę naują kiekybinį LH biologinio aktyvumo nustatymo būdą nesubrendusioms intaktinėms pelėms įvedant pastovią fiziologiškai švaraus FSH preparato dozę su vis didėjančia LH priemaiša ir po to išmatuojant gimdos masę, kaip atsaką proporcingą LH aktyvumui. Pagal gautus duomenis nustatyta, kad įvedus drauge su FSH 4,4 tarptautiniais vienetais viso labo tik LH 0,068 tarptautinius vienetus, pastarųjų pakanka, kad padidėtų gimdos masė.

Iš šių duomenų seka, kad pageidautina turėti absoliučiai išvalytą FSH preparatą, kuomet gydymui reikalingas FSH aktyvumas ir visiškai nereikia LH.

Kaip aukščiau paminėta, šiuo metu prekyboje esantis produktas Metrodinas® (Serono) yra išvalytas FSH preparatas, gautas metodu praktiškai identišku tam, kuris aprašytas Donini ir kt. aukščiau nurodytame darbe (Acta Endocrinologica, 52, p.186-198, 1986). Kokybės kontrolės techniniai reikalavimai atitinkamai su pateiktu nurodyto preparato biologiniu grynumu yra LH 0,7 tarptautinio vieneto /FSH 75 tarptautiniams vienetais, tai yra beveik aktyvumo biologinio mėginio jautrumo riba. Tačiau kai kurioms terapinėms priemonėms pageidautina, kad absoliučiai nebūtų LH aktyvumo. Be to, Metrodine® be žmogaus FSH dar yra pakankamas kiekis kitų šlapimo baltymų, tai reiškia, kad tai ne chemiškai grynas FSH preparatas.

Didžiosios Britanijos patento paraiškoje Nr. 2173803 siūlomas dar vienas hipofizio glikoproteininių hormonų, tarp kurių yra ir FSH, išgryninimo būdas. Šis būdas grindžiamas hormono komplekso su imobilizuotais antikūniais susidarymu ir po to sekančiu hormono

išplovimu tam tikslui panaudojant rūgštų vandeninį buferį, kurio pH nuo 3 iki 4. Gautas gerai išvalytas FSH turi tačiau tam tikrą kiekį priemaišų: 0,1 % masės sudaro LH priemaiša ir 0,5 % masės -
5 tireostimuliuojantis hormonas (TSH).

Apžvalginiam straipsnyje Skotas K. Čapelas ir kt. (Endokrininės apžvalgos, 4(2), p.179-211, 1983) aprašė FSH mikroheterogeniškumą ir FSH lydinčių molekulių
10 angliavandeninių dalių fiziologinę reikšmę. Galima prielaida, kad kai kurios modifikacijos vyksta metabolizmo metu iki pat šlapimo sekrecijos. Cheminė-fizinė diferenciacija parodyta eksperimente, lyginant labai išvalytą FSH, išskirtą iš šlapimo pagal šį
15 išradimą, su labai išvalytu FSH preparatu, išskirtu iš hipofizio.

Iki- ir po- transliacinės modifikacijos, matyt, ir sudaro FSH mikroheterogeniškumo pagrindą, FSH- tai
20 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
25 hipofizio. Galima prielaida, kad tai sąlygoja angliavandeninės dalys, o konkrečiai, sialo rūgšties galinės liekanos.
30

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

liuteinizuojančio hormono ir kitų šlapimo baltymų priemaišų pėdsakų.

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

10 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
15 stadijoje naudojami imobilizuoti monokloniniai antikūniai 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
20 reikšmėms.

Pagal šiame išradime pateikiamą būdą eliucijai patogų naudoti vandeninį tirpalą, kurio pH apytikriai 10 ir moliaringumas - apytikriai 0,5. Pateikėjų atlikti
25 eksperimentai parodė, kad esant tokioms sąlygoms, imobilizuoti antikūniai neinaktyvuojami. Tai prieštarauja aukščiau paminėtos patento paraiškos (Didžioji Britanija) (1 psl., 36-37 eilutės) doktrinai, skelbiančiai "Eliuentų, turinčių tokias aukštas pH
30 reikšmes, panaudojimas praktikoje neįmanomas, kadangi tai sukelia greitą antikūnių inaktyvaciją".

Ši skirtumą gali sąlygoti metodų, naudotų antikūnio surišimui su polimeru, skirtumai.

35 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.

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

- 10 Sekanti atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografijos stadija leidžia pašalinti bet kuri 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
15 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
20 žmogaus FSH (ZKG standartas) praranda biologinį aktyvumą skysčių chromatografijos su atvirkščiomis fazėmis metu. Kita vertus, tame pačiame straipsnyje parodomas patenkinamas biologinio aktyvumo atstatymas, tačiau pasiekiamas tik dalinis išvalymas, kuomet
25 žmogaus šlapimo preparatas, turintis tiek FSH, tiek ir LH, valomas aukščiau nurodytu būdu.

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

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

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

5

Tipišku atveju hibridomos 9/14 linijos ląstelės skrininguojamos optimalaus afiniškumo FSH atžvilgiu Kembridžo Universitete. Ląstelės kultivuojamos ir monokloniniai antikūnai produkuojami į supernatanto terpę, iš kurios jie išskiriami panaudojant 50% amonio sulfatą (skaičiuojant svorį tūriui). Po to naudojama atvirkščių fazių joninė chromatografija ir aukšto slėgio skystinė chromatografinė gel-filtracija ir dializė.

15

Ląstelių 9/14 linijos produkuojami ir nurodytu aukščiau būdu išvalyti monokloniniai antikūniai atitinka šiuos techninius reikalavimus:

20

a) baltymo švarumas ne mažiau 90%;

b) imunoglobulino klasė: IgG 1;

25

c) afiniškumo konstanta; $3,5 \times 10^8 \text{ l.mol}^{-1}$;

d) specifiškumas:

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

30

e) susijungimo su FSH geba tirpale: apie 1000 tarptautinių vienetų FSH 1 mg MoAK.

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

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 suspenduojama 1 litre 1 M natrio karbonato tirpalo (pH 11). Nuolat maišant, lašais pridedama 200 ml divinilsulfono. Reakcija pabaigiamą per 70 min kambario temperatūroje ir nutraukiama pridedant 1 N HCl tirpalo (pH iki 7,0).

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

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

Reikia suprasti, kad nors ZKH 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.

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

1 pavyzdys: Labai išvalyto šlapimo FSH gavimas

5 1 stadija: Imunovalymas panaudojant anti-FSH MoAK-DVS-Sefarozę.

ZKG naudojamas kaip išeitinė medžiaga.

10 Imunoderva anti-FSH MoAK-DVS-Sefarozė inkubuojama su 0,1 M. Tris-HCl, 0,3 M NaCl buferyje, pH 7,54°C temperatūroje. Į kolonėlę įvedama tam tikrą SH kiekį tarptautiniais vienetais (RIA), atitinkanti 80-90% bendros FSH rišančios gebos.

15 Laisvi baltymai eliuojami buferiu tol, kol eliuato optinis tankis apie 280 nm (oD 280) nebus mažiau 0,02.

20 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 (membrana C.O.10000 daltonų) ir
25 koncentruojamas iki mažo tūrio.

2 stadija. Atvirkščių fazių aukšto slėgio chromatografija

30 Gauta tirpalo pH privedamas iki 5,6, po to jis įvedamas į kolonėlę C18 su atvirkščiomis fazėmis (Pre Pak waters), kuri prieš tai buvo supusiausvyrinta 0,05 M buferiniu amonio acetato tirpalu kambario temperatūroje. Tirpiklio fronto judėjimo greitis - 100
35 ml/min. Eliuatas matuojamas ties 280 nm.

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

- 5 Biologiškai aktyvus labai išvalytas šlapimo FSH eliuojamas izopropanolio gradientu iki 50 % judrios fazės. Frakcijos tikrinamos panaudojant analitinę gel-chromatografiją ir radioimunoanalizę.
- 10 Organinis tirpiklis pašalinamas distiliuojant vakuume 40°C temperatūroje. Po to tirpalas užšaldomas ir liofilizuojamas.

2 pavyzdys: FSH tyrimas

- 15 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.
- 20

- 25 Išėitine medžiaga panaudotas neišvalytas žmogaus hipofizio ekstraktas, gautas kaip pašalinis produktas ekstrahuojant žmogaus augimo hormoną.

Metodika susideda iš sekančių stadijų:

- 30 1) Neišvalyto žmogaus hipofizio ekstrakto pirminis išvalymas ekstrahuojant 40% etanoliu, turinčiu 6% amonio acetato, pH 5,6, precipituojant supernatantą 96% šaltu etanoliu.
- 35 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 etanoliu.

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

4) FSH valymo paskutinė stadija, panaudojant joninę chromatografiją kolonėlėje SP 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; tarptautinis 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".

Atliekami sekantys tyrimai:

Kontaminacija LH

Šis testas atliekamas panaudojant specifinę LH (liuteinizuojantis hormonas) radioimunoanalizę su LH standarto pagalba graduoto pagal antrąjį 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.

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

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

5

Elektroforezė poliakrilamido gelyje su natrio dodecilsulfatu

10 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).

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

20 Šiuo metodu tiriamas tiek labai išvalyto FSH preparatas, gautas pagal šį išradimą, tiek ir labai išvalytas hipofizio FSH, 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.).

25 Abiejuose FSH preparatuose pagrindinė didžioji juosta, būdinga glikoproteidams, sutinkama vienos ir tos pačios molekulės masės, apytikriai 20000 daltonų, kas atitinka literatūrinius duomenis. Dėl žinomo glikoproteidų elgesio šios elektroforezės sąlygomis gautas dydis yra šiek tiek didesnis nei iš tikrųjų.

30

Mainų chromatografija

35 Labai išvalyti 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.

Fig. 2 pateikiami duomenys, kurie rodo įprastus pagrindinius šlapimo ir hipofizio FSH pikus, kurių laikai panašūs (atitinkamai 13,37 ir 13,35 min).

5 Izoelektrofokusavimas

Izoelektrofokusavimas atliekamas 5 % plonasluoksniame poliakrilamidiniame gelyje (Anfolin, LKB®, pH 3,5-9,5), fiksuojama 11,5 % (masės) trichloracto rūgštimi ir 3,5
10 % (masės) sulfosalicilo rūgštimi, dažoma sidabru iš BIO-RED? rinkinio.

Fig. 3 pateikti duomenys apie labai išvalytus FSH preparatus, išskirtus iš šlapimo ir hipofizio, išskaitant ir izoelektrinio taško markerius. Kaip matyti
15 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
20 aukštesniame pH intervale.

Šie bandymai rodo, kad šlapimo ir hipofizio FSH nėra identiškų molekulių ir kad jų skirtumus sąlygoja angliavandenilių, o gal ir pačių baltyminių dalių
25 skirtumai.

Biologinio aktyvumo kiekybinis nustatymas

Labai išvalyto šlapimo FSH preparato biologinį aktyvumą
30 in vivo nustato Stilmano- Rolej metodu (Endokrinologija, 53, p.604-616, 1953) naudodami kaip etaloną ZKH-Haus etaloną pagal 2-ąją Tarptautinę Etaloninę Preparatą ZKH, skirtą biologinio aktyvumo kiekybiniam nustatymui. Šią analizę priėmė visos
35 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

10 a) Šlapimo FSH subvienetų išskyrimas

Šlapimo FSH subvienetai išskiriami panaudojant aukšto slėgio skysčių chromatografijos sistemą Waters, turinčią kolonėlę Akvapor RP-300, 200 x 4,6 mm, 7 μ m (Braunli Lebs). Eliuentai sekantys: A=0,1 % TFA (trifluoracto rūgštis, Iners), B=0,055% TFA acetonitrile. 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 μ l 0,5 mg/ml FSH tirpalo ir 0,5 % TFA. Pradinė inkubacija TFA tirpale nebūtina. Preparatyviai išskiriama toje pačioje kolonėlėje. Gaunama 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 ištirpinami vandenyje, analizuojami aukšto slėgio skysčių chromatografija ir saugomi minus 20°C temperatūroje.

30

Beta-subvienetas eliuojamas apytikriai po 10,5 min kaip 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%.

35

b) Alfa- ir beta-subvienetų redukavimas ir karboksimetilinimas

5 Išskirtų, kaip aprašyta a) dalyje, subvienetų redukavimas atliekamas panaudojant 0,5 % Tris, 0,1 % EDTA, 6 M 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
10 moliaringumo negu DTT) ir paliekama 30 min tamsoje. Reakcija sustabdoma pridėjus 1% merkaptoetanolio ir TFA. Karboksimetilintus subvienetus valo aukšto slėgio skysčių chromatografija. Beta-karboksimetilintas subvienetas blogai tirpsta vandenyje, todėl galutinė
15 išeiga nereikšminga.

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

20 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
25 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%
30 acetonitrilu, 0,1 % TFA. Eliuotas frakcijos džiovinamos ir valomos aukšto slėgio skysčių chromatografija kaip tai aprašyta aukščiau. Išvalytas piridiletilintas beta-subvienetas ištirpinamas 1 % NH₄HCO₃ tirpale, pH 8.

35 d) Alfa-subvieneto sekvenavimas

Alfa-subvieneto, karboksimetilinto alfa-subvieneto arba viso labai išvalyto šlapimo FSH sekvenavimas (aminorūgščių liekanų sekos nustatymas) atliekamas panaudojant 5 nmolius 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 NH₂ 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 Ala, ir yra tos aminorūgštys, kur vyksta glikozilinimas. NH₂ gale visada yra nevienodumas ir jis visada toks pats visuose sekvenuotuose mėginiuose. Visa molekulė (t.y. prasidedanti Ala) būna 65 % grandinių, molekulė, neturinti pirmųjų dviejų aminorūgščių (t.y. prasidedanti Asp), pasitaiko 5% molekulių, o neturinti pirmųjų trijų aminorūgščių (t.y. prasidedanti Val) pasitaiko 30% atvejų.

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

Alfa-subvieneto nevienodumas

25 e) Beta-subvieneto sekvenavimas

Atliekamos kelios sekvenavimo serijos, panaudojant beta-subvienetus, karboksimetilintus beta-subvienetus, visą labai išvalytą žmogaus šlapimo FSH ir piridiletilinto beta-subvieneto tripsinizuotus peptidus. Mėginiai sudedami į baltymų sekvenserių (470 A9 Eplaid Biosistem) ir panaudojama programa 03PPTH, pateikta Eplaid Biosistem. Duomenys rodo kad šis

19

subvienetas turi 111 aminorūgščių ilgį ir sekančią seką:

10

5 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

10 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

100

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

15

110

Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

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

20

Beta-subvieneto NH₂ gale visada nevienodumas, kuris vienodas visuose sekvenotuose 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%.

25

1

5

35% grandinių Asn Ser Cys Glu Leu...

15% grandinių Ser Cys Glu Leu...

30% grandinių Glu Leu...

30 Beta-subvieneto nevienodumas

3 pavyzdys: Vaistiniai preparatai

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.

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

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.

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

Gaminant injekcinius preparatus, pasirinktinai gali keisti pH iki tam tikros reikšmės, pridedant 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.

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:

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 μ m dydžio.

- 5 200 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.

15 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.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Baltymas, turintis alfa- ir beta-subvienetus, kurio
 5 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

10

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

15

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

20

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

25

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).

30

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).

35

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:

5		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	
10	Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr	
	40	50
	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	
15	70	
	Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn	
	80	90
	His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys	
20	Ser Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys	

5. Baltymas pagal bet kurį 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).

6. Baltymas pagal bet kurį 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).

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

8. Baltymas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad glikozilinami 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.
- 15
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.
- 20
12. Biologiškai aktyvus iš šlapimo išskirtas folikulus stimuliuojantis hormonas, neturintis liuteinizuojančio hormono ir kitų šlapimo baltymų priemaišų pėdsakų.
- 25
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.
- 30
14. Baltymas pagal 9 ar 12 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pasižymi santykinio aktyvumu, ne mažesniu kaip 6200 tarptautinių vienetų FSH 1 mg liofilizuotų miltelių.
- 35
15. Baltymo pagal bet kurią iš 1-14 punktų gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad poklimaksinio šlapimo koncentratą valo imuniniu būdu, panaudojant specifinius FSH imobilizuotus monokloninius antikūnus, po to eliuoja FSH, iš kurio išvalo bet kokius

pėdsakinius priemaišų kiekius tam tikslui panaudojant atvirkščių fazių aukšto slėgio skysčių chromatografiją.

16. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
5 tuo, kad išeitime medžiaga panaudojamas žmogaus klimaksinis gonadotropinas.

17. Būdas pagal 15 arba 16 punktą, b e s i s k i r i a -
n t i s tuo, kad iš imunokomplekso eliminuojant FSH
10 kaip eliuentą panaudoja vandeninį tirpalą, kurio pH
aukštesnis negu 10, ir moliaringumas aukštesnis negu
0,5.

18. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
15 tuo, kad eliuento pH yra nuo 11,3 iki 11,7 ir
moliaringumas apie 1.

19. Būdas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
20 tuo, kad eliuentas yra 1M amoniakas.

20. 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.

21. Vaistinis preparatas pagal 20 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad turi tinkamą užpildą.

22. Vaistinis preparatas pagal 21 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad užpildas yra laktozė.

23. Vaistinis preparatas pagal bet kurią iš 20-22
30 punktų, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad yra
lioofilizuotoje injekcijoms skirtoje formoje.

24. Vaistinis preparatas pagal bet kurią iš 20-23
35 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad skirtas
poodiniam išvirkštimui.

25. Vaistinis preparatas pagal 20 punktą, b e s i s-
k i r i a n t i s tuo, kad turi 75 tarptautinius
vienetus FSH ampulėje.
- 5
26. Vaistinis preparatas pagal 20 punktą, b e s i s-
k i r i a n t i s tuo, kad turi 150 tarptautinius
vienetus FSH ampulėje.
- 10
27. Vaistinis preparatas pagal bet kuri iš 20-26
punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi
žmogaus albuminą kaip stabilizatorių.
- 15
28. Baltymo pagal bet kuri iš 1-14 punktų panaudojimas
vaistinio preparato pagal 20 punktą gamybai.

I.E.F.

9.30

8.05

8.45

8.15

7.35

6.85

6.55

5.85

5.20

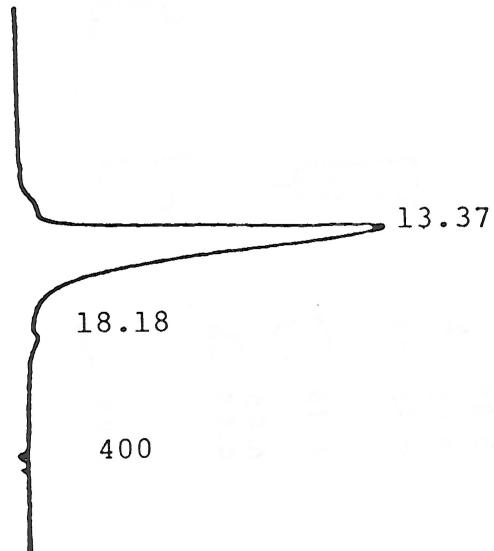
4.35

3.50

Fig.1

Fig.3

uFSH



pFSH

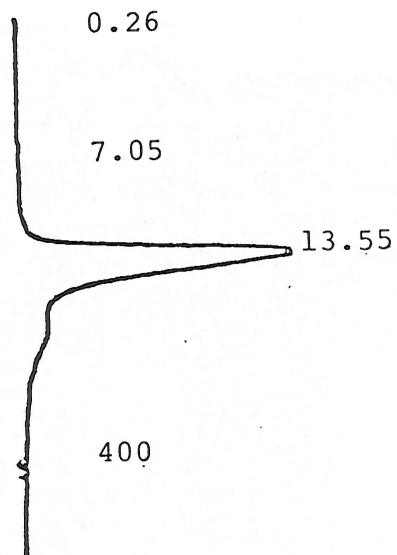


Fig.2