

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201892353** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.29

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.14

**(54) СОМАТОТРОПИН ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ, ПОЛИНУКЛЕОТИД,
РЕКОМБИНАНТНАЯ КЛЕТКА, ПРЕПАРАТ**

(96) **2018000143 (RU) 2018.11.14**

(74) Представитель:
Федорова Е.А. (RU)

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ (RU)**

(57) Группа изобретений относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использована для продления действия соматотропина. Предложен соматотропин пролонгированного действия, включающий соматотропин и часть Fc-фрагмента IgG1, модифицированного включением пятикратно последовательно усилителя гидродинамического радиуса, соединенные гибким мостиком, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, а также полинуклеотид, его кодирующий, генетическая конструкция, рекомбинантная клетка, препарат разработанного соматотропина, препарат для синтеза в целевом организме разработанного соматотропина. Изобретения позволяют главным образом получить пролонгированное действие гормона роста человека *in vivo*, причем тип динамики концентрации характерен для ГРЧ.

201892353

A1

A1

201892353

Соматотропин пролонгированного действия, полинуклеотид, рекомбинантная клетка, препарат

Группа изобретений относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине, и может быть использована для продления действия соматотропина.

Соматотропный гормон (соматотропин, соматропин, гормон роста человека) – один из гормонов передней доли гипофиза. Вызывает выраженное ускорение линейного (в длину) роста, в основном за счет роста длинных трубчатых костей конечностей. Соматотропин оказывает мощное анаболическое и анти-катаболическое действие, усиливает синтез белка и тормозит его распад, а также способствует снижению отложения подкожного жира, усилению сгорания жира и увеличению соотношения мышечной массы к жировой. Кроме того, соматотропин принимает участие в регуляции углеводного обмена – он вызывает выраженное повышение уровня глюкозы в крови и является одним из антагонистов инсулина по действию на углеводный обмен. Описано также его действие на островковые клетки поджелудочной железы, иммуностимулирующий эффект, усиление поглощения кальция костной тканью и др.

Терапевтическое применение соматотропина:

1. Для лечения нарушений роста у детей.
2. Для лечения нервных расстройств. В некоторых работах показано, что соматотропин улучшает память и познавательные функции, особенно у больных с недостаточностью соматотропной функции гипофиза, и что введение соматотропина может улучшать настроение и самочувствие больных с низким уровнем соматотропина в крови.
3. Для профилактики старческих заболеваний
4. Применение в спортивной медицине в качестве анаболического препарата.

Продление периода активности данного белка в организме является актуальной задачей. Решением данной задачи может быть модификация его структуры.

В документе EA008505 (29.06.2007) описан химически модифицированный гормон роста человека - связанный с водорастворимым полимером. Молекула представлена конъюгатом гормон роста человека (hGH) - полиэтиленгликоль (PEG), связанными ковалентно, где PEG представляет собой метоксиполиэтиленгликоль (молекулярная масса примерно 30 кДа), конъюгированный с аминоконцевой α -аминогруппой фенилаланина.

В документе RU2539797 (27.02.2013) предложено производное гормона роста человека, содержащее дополнительную дисульфидную связь по сравнению с ГРЧ, и обладающее активностью гормона роста человека. Такое производное ГРЧ обладает повышенной стабильностью и устойчивостью к протеолитическому расщеплению в результате мутаций, ведущих к замене некоторых аминокислотных остатков на остатки

цистеина. Производное гормона роста может быть дополнительно химически модифицировано посредством присоединения группировок, таких как: ПЭГ, углеводы, альбумин-связывающие группы, жирные кислоты, алкильные цепи, липофильные группы, витамины, желчные кислоты или спейсеры, присоединяющиеся к боковой или к главной цепи производного гормона роста.

Однако производство действующего вещества, представленного компонентами, получаемыми с использованием совершенно разных механизмов, и их конъюгация, является технически сложной задачей. Введение же мутаций в структуру соматотропина может приводить к проблемам во взаимодействии с рецептором.

Прототипом предлагаемого нами изобретения, гибридного белка, считаем изобретение, раскрытое в публикации ЕА201490393 (30.01.2015). В ней раскрыт модифицированный соматотропный гормон, в одном из вариантов представленный следующей структурой. К С-концу соматотропного гормона присоединен карбокси-концевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина (ХГ). СТР присоединены посредством линкера, представляющего собой пептидную связь. Предлагают применение такого гибридного белка в способах стимулирования потери веса или снижения телесного жира, способах увеличения уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) и способах снижения частоты приема соматотропного гормона у человека. Также раскрываются фармацевтические композиции, содержащие такие конструкции соматотропного гормона и другие известные эксципиенты и носители – прототип предлагаемого нами препарата.

Однако СТР является участком, индивидуальным для ХГ (Заморина С.А. Механизмы иммуномодулирующей активности хорионического гонадотропина. дис. ... докт.биол.наук: 14.03.09 – Южно-Уральский государственный медицинский университет. – Челябинск. – 2013). Данный гормон обладает выраженной иммуномодулирующей активностью, т.е. оказывает собственное действие на организм. Использование его специфического участка может повлечь за собой иммунные реакции в организме, что является крайне нежелательным. Учитывая, что авторы говорят о длительности действия гибридного белка, содержащего такие фрагменты, эффект может быть непредсказуемым, в том числе нежелательным. Например, известно под воздействием ХГ угнетение цитотоксического адаптивного иммунного ответа и усиление антительного.

В случае предложенного нами изобретения иммунные реакции не индуцируются – использована часть Fc-фрагмента IgG1 антитела, не антитело целиком, причем с модификацией, в связи с чем присоединение к нему соматотропина не ведет к изменениям в структуре такого фрагмента и, соответственно, к активации системы комплемента. Кроме

того, в часть Fc-фрагмента IgG1 антитела введен пятикратно последовательно усилитель гидродинамического радиуса из аминокислотных остатков, что также не позволяет опосредовать какие-либо иммунологические или иные реакции, при этом позволяя увеличить длительность циркуляции активного соматотропина в организме.

Технический результат от использования изобретения выражается в большей специфичности и безопасности модифицированного соматотропина. Это достигается использованием не обладающего собственной активностью фрагмента, сшитого с соматотропином, и лишь у С-концевой части последнего, а не у обоих концов ГРЧ, а также за счет наличия гибкого мостика между ГРЧ и модифицирующим фрагментом.

Технический результат от использования предлагаемого нами гибридного белка по изобретению заключается также в расширении спектра действующих веществ для получения продления действия соматотропина. При противопоказаниях к применению аналогов, либо нежелании использовать аналоги ввиду их вышеописанных недостатков, данный белок позволит получить продление действия соматотропина. В отношении соматотропина наличие широкого спектра аналогов является важным также поскольку известно, что организм через некоторое время перестает откликаться даже на обычный соматотропин даже произведенный одним способом.

В той же публикации раскрыт полинуклеотид, кодирующий модифицированный соматотропин структуры СТР-ГРЧ-СТР. Считаем его прототипом. Однако не указано, для экспрессии в каком организме предлагается использовать данный полинуклеотид.

Технический результат от использования изобретения выражается в большей специфичности и соответственно безопасности кодируемого белка, за счет наличия иного, не имеющего собственной функциональной активности модифицирующего соматотропин фрагмента, и лишь у его С-концевой части, а не у обоих концов ГРЧ, а также за счет наличия гибкого мостика между ГРЧ и модифицирующим фрагментом.

Технический результат выражается и в более высоком уровне синтеза кодируемого белка в целевом организме или продуценте, за счет оптимизации полинуклеотида по кодонному составу.

Технический результат от использования предлагаемого нами полинуклеотида заключается также в расширении спектра полинуклеотидов для получения соматотропина пролонгированного действия.

В той же публикации раскрыта и генетическая конструкция для синтеза модифицированного описанным выше способом соматотропина в клетках продуцента, либо целевого организма.

Технический результат заключается в увеличении выраженности и длительности эффекта и достигается тем, что нуклеотидная последовательность гибридного гена кодонно оптимизирована для экспрессии в целевом организме или продуcente, в результате синтез белка идет интенсивнее. При внедрении в практику это позволит существенно снизить количество вводимой ДНК, по сравнению с дозами, используемыми в настоящее время в отечественной и мировой практике при генной терапии.

Помимо этого, технический результат заключается в увеличении безопасности. Указанный технический результат достигается тем, что синтезируемый в целевом организме или продуcente с генетической конструкции белок не вызывает дополнительные эффекты, помимо обусловленных ГРЧ в его структуре.

Технический результат также совпадает с перечисленными выше для полинуклеотида.

В ЕА201490393 описан и продуцент вариантов предложенного теми авторами гибридного белка, однако различий довольно много, и его не рассматриваем в качестве прототипа рекомбинантной клетки по настоящему изобретению.

В ЕА008505 описаны препараты ПЭГ-вариантов соматотропина.

Технический результат от использования препарата соматотропина пролонгированного действия по настоящему изобретению – в естественном для ГРЧ типе динамики концентрации – достигается максимальная концентрация в первый час после введения, затем падает, в противовес достижению максимальной концентрации по прошествии нескольких часов. Данный технический результат достигается разработанной структурой молекулы действующего вещества.

Технический результат также заключается в улучшенной стабильности в организме, в кровотоке – предельный период полужизни больше. Данный технический результат достигается разработанной структурой молекулы действующего вещества.

Технический результат от использования препарата разработанного гибридного белка также аналогичен таковому гибридного белка (несколько).

Продуцент генетической конструкции и препарат на основе генетической(их) конструкции(й), с которой(ых) в клетках целевого организма синтезируется предложенный нами гибридный белок, не известны из уровня техники, как и близкие аналоги.

Технический результат от использования продуцента заключается в получении генетической конструкции, соответственно, и препаратов по изобретению.

В ЕА201490393 упоминается генная терапия, однако данные по испытанию не приведены.

Технический результат от использования препарата для синтеза в целевом организме соматотропина пролонгированного действия совпадает с перечисленными выше для генетической конструкции.

Также технический результат выражается при генной терапии в снижении количества препарата вводимой ДНК и/или в уменьшении частоты введения препарата. Это достигается за счет структуры действующего вещества препарата.

Сущность изобретения

Предложен соматотропин пролонгированного действия, включающий соматотропин и часть Fc-фрагмента IgG1, модифицированного включением пятикратно последовательно усилителя гидродинамического радиуса, соединенные гибким мостиком, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1. Также предложен полинуклеотид, его кодирующий, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках продуцента данного белка, либо целевого организма. Предложена генетическая конструкция для синтеза описанного выше соматотропина в клетках продуцента, либо целевого организма, включающая описанный выше полинуклеотид и элементы, позволяющие реализовать указанное назначение.

Предложены также бактериальная клетка для продукции такой генетической конструкции и рекомбинантная клетка для продукции такого соматотропина. Предложен препарат описанного выше соматотропина, содержащий такой соматотропин в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор. Также предложен препарат для синтеза в целевом организме соматотропина пролонгированного действия, содержащий по меньшей мере одну описанную выше генетическую конструкцию в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор.

Подробное описание изобретения

Предложена группа изобретений: гибридный белок, полинуклеотид, генетическая конструкция, продуцент, препарат.

Предложен модифицированный для пролонгированного действия гормон роста человека, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1. Он представляет собой сшитые гибким мостиком соматотропин и часть Fc-фрагмента антитела изотипа IgG1, последний модифицирован включением пятикратно последовательно усилителя гидродинамического радиуса (далее – «PAV-мотив»). Такой PAV-мотив состоит из гидрофобных аминокислот - (AAAPAVPAVPPP)x5 - и обеспечивает увеличение

гидродинамического радиуса (hydrodynamic volume) молекулы. Возникает кажущаяся масса молекулы 691 кДа тогда как общая молекулярная масса - всего 98 кДа, что измеряется методом SEC. PAV-мотив введен в структуру константного домена антитела в область, где он не влиял на третичную структуру Fc-фрагмента, но увеличивал его «кажущийся» радиус до 700 кДа. Данная область была выявлена в результате тщательного анализа третичной структуры Fc-фрагмента IgG1.

Часть Fc-фрагмента антитела изотипа IgG1, модифицированного описанным выше способом, соединена через гибкий глициновый мостик с С-концом соматотропина. Область соматотропина для соединения выбрана, учитывая взаимодействие с рецептором. Для того, чтобы сохранить биологическую функцию молекулы гормона роста, модифицированный Fc-фрагмент соединили с молекулой таким образом, чтобы он не мешал взаимодействию с рецептором.

Общая структура соматотропина пролонгированного действия: гормон роста-глициновый мостик-часть Fc рецептора с усилителем гидродинамического радиуса внутри. В последовательности аминокислот SEQ ID NO.:1 ГПЧ представлен аминокислотными остатками 1-191, глициновый мостик - 192-197, фрагменты Fc рецептора – 198-323 и 384-492, усилитель гидродинамического радиуса – 324-383. Молекулярная масса структуры – 54 кДа.

Предложен полинуклеотид, кодирующий описанный гибридный белок, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках продуцента, либо целевого организма. Целевой организм - организм, в котором желательно осуществить синтез соматотропина. При известности аминокислотной последовательности белка специалист в данной области сможет получить нуклеотидную последовательность. Кодонную оптимизацию проводят самостоятельно, используя информацию о частоте встречаемости кодонов у продуцента, например, в базе данных [например, Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):292], либо с использованием специализированных программ, например, представленной на сайте <http://www.encorbio.com/protocols/Codon.htm>, либо http://molbiol.ru/scripts/01_19.html.

Предложена генетическая конструкция для экспрессии в клетках продуцента, либо целевого организма описанного полинуклеотида; каждая конструкция включает, помимо полинуклеотида, элементы, позволяющие реализовать указанное назначение.

Под генетической конструкцией для экспрессии в клетках целевого организма подразумевается «короткая» линейная конструкция, либо рекомбинантный вектор, в

кольцевой, либо линейной форме, который может быть представлен плазмидным, либо вирусным вектором.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез гибридного белка в клетках продуцента, должна содержать, помимо гибридного гена, кодирующего белок по изобретению, элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, и эффективного функционирования согласно назначению, а также для селекции трансформанта.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез гибридного белка в клетках целевого организма, рекомбинантный вектор, должна содержать, помимо гибридного гена, кодирующего белок по изобретению, элементы для поддержания и амплификации и эффективного функционирования согласно назначению.

Такие генетические конструкции экономически наиболее выгодно набирать в прокариотических клетках, преимущественно бактериальных клетках. В связи с этим такие генетические конструкции по настоящему изобретению содержат элементы для поддержания и амплификации, преимущественно в больших количествах, в клетках бактерий. Такими существенными элементами являются прокариотический ориджин репликации, для поддержания в клетке со средней, предпочтительно высокой, копийностью, и ген для возможности селекции штамма-продуцента - ген, обуславливающий устойчивость к антибиотику, либо ген, завершающий ауксотрофию. Подходящий ориджин репликации для, например, плазмидного вектора представлен, например, pM1 (der.), ColE1 (der.) и F1, pUC и F1, SV40, но не ограничивается ими. Также может содержаться элемент для интеграции конструкции в геном продуцента. Например, 3' AOX1 или 18S рРНК для дрожжей.

Под элементами для селекции трансформанта подразумевают, как правило, ген, обуславливающий устойчивость к антибиотику, либо ген, завершающий ауксотрофию. При использовании бактерии в качестве продуцента селективный маркер может быть представлен, например, геном устойчивости к ампициллину, либо канамицину, либо тетрациклину; дрожжей - например, геном LEU2, либо TRP1, либо URA3; грибов - например, геном устойчивости к биалафосу, либо гигромицину, либо ауреобасидину, либо блеомицину; растений - например, геном устойчивости к канамицину, либо биалафосу; клеток млекопитающих - например, геном устойчивости к неомицину.

Генетическая конструкция, обеспечивающая синтез гибридного белка в клетках целевого организма, «короткая» линейная конструкция, должна содержать, помимо гибридного гена, кодирующего белок по изобретению, элементы для эффективного функционирования согласно назначению. Нарботку такой генетической конструкции

экономически наиболее выгодно осуществлять с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Под элементами для эффективного функционирования, для экспрессии закодированного белка, подразумеваются сигналы инициации транскрипции, промотор, сигналы инициации трансляции, старт-кодон и стоп-кодон(ы), терминирующие транскрипцию последовательности, регуляторные последовательности. Также возможно наличие секреторной последовательности.

При использовании в качестве продуцента организма *Escherichia coli* промотор может быть представлен, например, промотором оперона лактозы, оперона триптофана; дрожжей - например, промотором гена кислой фосфатазы, гена алкогольдегидрогеназы, гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гена метаболизма галактозы; грибов – например, промотором гена целлюбиогидролазы, либо α -амилазы, либо глюкоамилазы, либо глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, либо гена *abp1*; растений – например, промотором CaMV 19S RNA или CaMV 35S RNA, либо промотором гена нопалинсинтетазы. При использовании в качестве продуцента клеток млекопитающего, например, промотор может быть представлен природным промотором со своими регуляторными элементами (например, CaM kinase II, CMV, nestin, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, ρ -globin, GFAP, GAP43, тирозингидроксилаза, субъединица 1 каинатного рецептора и субъединица В глутаматного рецептора и другие), либо синтетическим с регуляторными последовательностями, для получения необходимого характера экспрессии (соотношения продолжительности и уровня экспрессии) целевого гена на уровне транскрипции.

Сигналы инициации трансляции - последовательность Шайна — Дальгарно [Kapp L. D., Lorsch J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation // Annual Review of Biochemistry 73/2004, 657—704] у прокариот и последовательность Козак у эукариот [Kozak M. (1986) "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes", Cell 44, 283-292]. При использовании клеток млекопитающих последовательность Козак непосредственно перед стартовым кодоном ATG позволяет увеличить уровень экспрессии [Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. EMBO J. 1997;16(9):2482–2492].

Терминирующая последовательность является одним из элементов, обуславливающих стабильность мРНК. Терминирующая последовательность для эукариот содержит последовательно стоп-кодон, 3' нетранслируемую область с сигналом и сайтом полиаденилирования, стоп-кодон, за счет чего сохраняется стабильность мРНК, и осуществляется надлежащее прекращение транскрипции и экспорт мРНК из ядра.

Терминирующая последовательность представлена нативной, т.е. исходной для кДНК используемого белка, либо иной, более сильной, которая представлена, например, для клеток млекопитающих терминирующей последовательностью бычьего гормона роста (BGH), но ею не ограничивается, и может содержать дополнительный стоп-кодон перед 3' нетранслируемой областью. Пример терминирующей последовательности для клеток растений - таковая гена нопалин синтетазы (NOS T).

Регуляторные последовательности – нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования генетической конструкции. Возможные регуляторные последовательности по отношению к промотору – это энхансер, для увеличения уровня экспрессии через улучшение взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК, инсулятор, для модулирования функций энхансера, сайленсеры, либо их фрагменты, для снижения уровня транскрипции, например, для тканеспецифической экспрессии, 5' нетранслируемая область до промотора, включая интрон. При использовании сайленсера, либо инсулятора в составе конструкции возможно регулировать экспрессию целевого гена.

Генетическая конструкция для синтеза белка в клетках эукариот в одном из вариантов по настоящему изобретению содержит от одной из вышеприведенных регуляторных последовательностей, в зависимости от варианта генетической конструкции, основанного на выборе промотора и желаемых параметрах экспрессии целевого гена. Иные регуляторные последовательности:

- нетранслируемая область downstream от промотора, включая интрон, для повышения стабильности мРНК и увеличения экспрессии целевого гена.

Генетическая конструкция для синтеза белка в клетках эукариот по настоящему изобретению в одном из вариантов дополнительно содержит такой регуляторный элемент.

Для секреции гибридного белка по изобретению, на N-конец полинуклеотида, кодирующего целевой ген, помещают фрагмент, кодирующий сигнальный пептид, подходящий для используемого продуцента, либо целевого организма. Примеры таких секреторных последовательностей описаны в литературе [например, для *E.coli* – в патенте РФ №2198179, дата приоритета 15.09.1999, для дрожжей – в патенте РФ №2143495, дата приоритета 08.07.1994, патенте США №4546082, дата приоритета 17.06.1982, европейских заявках на изобретение №116201, 123294, 123544, 163529, 123289, заявке на изобретение Дании 3614/83, дата приоритета 08.08.1983, для растений - в статьях Kapila J, Ryske RD, Van Montagu M, Aengen G (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci 122: 101-108, Stiefel, V., Ruiz-Avila, L., Raz, R., Valles, M.P., Ghez,

J., Pages, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Ludevid, M.D., Langdale, J.A., Nelson, T., and Puigdoménech, P. (1990). Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation. *Plant Cell* 2, 785-793]. Причем может содержаться нативная, либо гетерологичная секреторная последовательность, кодонно оптимизированная для клетки, в которой осуществляется синтез гибридного белка по изобретению. В одном варианте изобретения генетическая конструкция для синтеза гибридного белка в клетках млекопитающих содержит нативную для ГРЧ секреторную последовательность (MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSA), либо секреторную последовательность TPA (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_000921.1), но ими не ограничивается. Преимущество использования секреторной последовательности TPA - в обширном предшествующем клиническом опыте, а также в том, что показана ее высокая производительность в отношении экспрессии секретируемого белка с различных генов-мишеней.

Могут содержаться и иные элементы, требуемые для функционирования экспрессионной системы. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты таких элементов и их использования, генетическая конструкция по настоящему изобретению может содержать любые отвечающие вышеуказанным условиям комбинации, при которых с генетической конструкции осуществляется синтез гибридного гена в клетках продуцента, либо целевого организма.

Последовательность расположения описанных элементов в генетической конструкции понятна среднему специалисту в данной области.

Генетическая конструкция для экспрессии в клетках продуцента может быть представлена, в зависимости от совместимости с продуцентом, вирусным, плазмидным, фосмидным, космидным или иным возможным вектором. К примеру, при выборе в качестве продуцента клеток *E. coli*, ген может быть в составе бактериофага, например, на основе фага λ , либо плазмиды, например, на основе pBR, либо pUC, и подобное. При использовании в качестве продуцента организма *Bacillus subtilis* ген может быть, например, в составе плазмиды на основе pUB. При использовании в качестве продуцента дрожжей генетическая конструкция может быть представлена, например, плазмидой на основе YEp, либо YRp, либо YCp, либо YIp. При использовании в качестве продуцента клеток млекопитающих, генетическая конструкция может быть представлена, например, плазмидой, например, pVAX1, pcDNA3.1, либо аденоассоциированным вирусом, но ими не ограничивается.

Подходящие генетические конструкции для экспрессии в клетках целевого организма - млекопитающих представлены известными среднему специалисту в данной области и описанными в литературе [Hartikka J, Sawdey M, Cornefert-Jensen F, Margalith M,

Barnhart K, Nolasco M, Vahlsing HL, Meek J, Marquet M, Hobart P, Norman J, Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. Hum Gene Ther. 1996 Jun 20;7(10):1205-17 и др.], а также теми, которые могут быть созданы средним специалистом в данной области с использованием рекомендаций по элементам векторов [“Cloning Vectors”, ed. Pouwls et al., Elsevier, Amsterdam- New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018 и др.]. Предпочтительными генетическими конструкциями для использования у человека являются векторы, проверенные на людях, содержащие описанные выше элементы с соответствующими регуляторными последовательностями, возможно, модифицированные для соответствия заявленным критериям, что позволяет уменьшить количество требуемых исследований для регистрации средства. Однако возможно и использование иных генетических конструкций, содержащих требуемые описанные элементы.

Предложена рекомбинантная клетка для продукции описанного гибридного белка – прокариотический организм, либо эукариотического организма. Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, эукариотический продуцент - грибами, клетками растений, млекопитающих.

Предложена бактериальная клетка для продукции генетической конструкции по изобретению. Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Примеры выше приведены для наглядности реализации изобретений (генетическая конструкция, продуцент), но реализация ими не ограничивается. На сегодняшний момент в научной литературе (например, учебники по молекулярной биологии, биотехнологии, статьи, специализированные сайты в интернете с базами данных, например, векторов) описано множество экспрессионных систем, а также методик их создания и работы с ними, в связи с чем специалисту понятно, что представленное описание группы изобретений позволяет их осуществить.

Предложен препарат соматотропина пролонгированного действия, либо препарат для синтеза такого белка в целевом организме. Он содержит описанный гибридный белок, в качестве активного агента, либо не менее одной из описанных генетических конструкций для синтеза гибридного белка в клетках целевого организма, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор. Фармацевтически приемлемые носители или буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences. В качестве потребителя препарата может выступать как человек, так и животное, в том числе из домашних или сельскохозяйственных животных.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованных изобретений и их эффективность. Полученные результаты исследований проиллюстрированы следующими примерами.

Краткое описание чертежей

Пример 1. Моделирование гибридного белка

Для моделирования гибридного белка были произведены следующие действия:

1. Поиск компонентов гибридного белка
2. Построение модели целого белка для определения ориентации доменов
3. Построение моделей для каждого домена (с использованием образцов 3D структур и *ab initio*)
4. Докинг моделей с использованием модели целого белка.

Для получения наиболее реалистичных результатов в автоматическом режиме использовали алгоритм I-Tasser для моделирования белков.

Смоделированный гибридный белок был проанализирован с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>), по аминокислотной последовательности. Получены следующие данные. Соматотропин пролонгированного действия, включающий соматотропин и часть Fc-фрагмента IgG1, модифицированного включением пятикратно последовательно усилителя гидродинамического радиуса, соединенные гибким мостиком, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, состоит из 492 а.о., и имеет молекулярную массу 54 кДа, pI 5,9.

Основываясь на расчетах указанной выше программы, во всех типах клеток поддерживается оптимальный период полужизни разработанного соматотропина при наличии метионина на его N-конце. При экспрессии гибридного полинуклеотида в любой клетке синтезируется белок с метионином на N-конце, поскольку трансляция всегда начинается со старт-кодона. Далее метионин может отщепляться, либо естественным путем, например, если белок секретируемый, в составе секреторного пептида, либо его можно отщепить при очистке белка, как, например, в случае с некоторыми белками, получаемыми в клетках *Escherichia coli* и иных бактерий. Таким образом, возможен вариант гибридного белка по изобретению с метионином на N-конце, либо без него.

Пример 2. Получение высокоочищенного гибридного белка согласно изобретению с использованием прокариотического организма

Перевели аминокислотную последовательность рассчитанного гибридного белка в нуклеотидную, одновременно проведя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках

E.coli с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции. Синтезировали рассчитанный ген химически.

Полученный ген клонировали в бактериальном экспрессионном векторе pET28a(+) по рестрикционным сайтам, фланкирующим таргетный ген, по инструкции к вектору.

Для создания штамма-продуцента использовали клетки *E.coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λ De3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. lon- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Подготавливали клетки *E. coli* штамма BL21 с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3) следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение 16 ч в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Разводили культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и выращивали на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру разводили свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Переносили 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждали клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедуру отмывки повторяли трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 сек. при 5000 об/мин. на микроцентрифуге.

Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию на электропораторе MicroPulser (BioRad) в стерильных ячейках при электрическом импульсе напряженностью 10 кВ/см длительностью 4 мсек.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) в течение 40 мин. при +37°C. 10–100 мкл клеточной суспензии высевали на селективную LB-среду (Gibco BRL, США), содержащую канамицин (50 мкг/мл), для отбора клонов, содержащих плазмиды (штаммов-продуцентов).

Выросшие колонии *E. coli* проверяли на наличие плазмид со вставкой целевого гена. Клон клеток, содержащих искомую плазмидную ДНК, считали штаммом-продуцентом

гибридного белка. Таким образом был получен штамм-продуцент гибридного белка по изобретению.

Для культивирования полученного штамма-продуцента использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую канамицин в концентрации 50 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм.

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудиера (Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005 May; 41(1):207-34) использовали среду RYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы. В качестве индуктора использовали 0.2% лактозу.

В среду RYP-5052, содержащую канамицин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 20 часов до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 час. Отбирали аликвоту клеток на анализ экспрессии гена, кодирующего гибридный белок, методом электрофореза в ПААГ, а оставшуюся биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Осажденные клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 100 мМ трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, 100 мМ хлористого натрия, 1% Triton X-114, 5% глюкозы pH 8,0 из расчета на 1 г клеток на 10 мл буфера. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком 15 минут с параметрами по 30 сек с интервалом в 30 сек (частота ультразвука составляет 22 кГц). Клеточный лизат центрифугировали 10 мин. при +4°C, 5000 g. Отбирали пробу надосадочной жидкости (супернатанта) и осадка (тельца включения) для анализа локализации белка и оценки его растворимости, с использованием SDS-PAGE (Фиг. 1). Осадок содержал белок массой около 54 кДа, что соответствует рассчитанной массе разработанного соматотропина (54 кДа), таким образом, анализ продемонстрировал нерастворимость полученного белка и его локализацию в тельцах включения. Полученный препарат содержал около 30% гибридного белка от общего количества белков *E. coli*.

Супернатант сливали, к осажденным тельцам включения добавляли раствор 1 М мочевины из расчета 10 мл на 1 г клеток, интенсивно перемешивали. Повторяли центрифугирование. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в растворе 2 М мочевины того же объема. Повторяли центрифугирование, сливали супернатант, осадок

(тельца включения) растворяли в растворе 8 М мочевины из расчета 1 г на 10 мл и использовали для выделения гибридного белка.

Полученные тельца включения рекомбинантного белка разрушали путем инкубации с лизирующим буфером, содержащим 500мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий, в течение часа. К клеткам, собранным центрифугированием из 50 мл культуры, добавляли по 8 мл лизирующего буфера.

Колонку, содержащую Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивали буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли по методу Лоури. Далее материал анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с добавлением ДДС-Na. Гели окрашивали Кумасси G-250.

Получили препарат гибридного соматотропина чистотой около 98%, по данным SDS-PAGE, выход белка составил 50 мг из 1 литра жидкой культуры штамма-продуцента (Фиг. 2).

Пример 3. Получение высокоочищенного гибридного белка согласно изобретению с использованием эукариотического организма

3.1. Получение высокоочищенного гибридного белка с использованием клеток дрожжей.

Перевели аминокислотную последовательность рассчитанного гибридного белка в нуклеотидную, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках дрожжей *Pichia pastoris* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген области для получения секретируемого белка, по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pHIL-S1, по инструкции к вектору.

Подготавливали клетки дрожжей к трансформации. Провели культивирование и заморозку клеток *Pichia pastoris* штамма SMD1163, дефектного по нескольким протеазам дрожжей, что обеспечивает стабильность секретируемого белка. Клетки высевали в стерильных условиях на агар в среде YPD (1% - дрожжевой экстракт, 2% - пептон, 2% -

глюкоза, 1 мМ дитиотреитол), культивировали при 30°C, затем пересевали в суспензию и культивировали в течение 16 ч. Часть клеток ресуспендировали в YPD среде с добавлением 15% глицерина и замораживали при -86°C. Для получения компетентных клеток предварительно выращивали колонии клеток в чашке с агаром в YPD среде при 30°C в течение двух дней. Затем содержимое одной колонии выращивали в 10 мл YPD среды при 30°C в течение 16 ч. Разбавляли суспензию в YPD до ОП₆₀₀ 0.2 и конечного объема 10 мл и выращивали культуру до ОП₆₀₀ 0-8 в течение 4 часов. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 500 g, выливали супернатант, ресуспендировали в 10 мл раствора I из набора для трансформации EasyComp Transformation Kit, вновь центрифугировали и ресуспендировали осадок в растворе I. Аликвоты компетентных клеток по 50-200 мкл разливали в стерильные пробирки объемом 1.5 мл, которые хранили при температуре -90°C до использования.

Для трансформации использовали набор EasyComp Transformation Kit, входящий в состав Pichia Easy Select Kit (Invitrogen), реакцию проводили по инструкции к набору. Полученную суспензию клеток рассеивали в стерильную чашку на агаровый гель, приготовленный на среде YPD с добавлением 1М сорбитола и антибиотика ампициллина в конечной концентрации 100 мкг/мл. Через 3 суток получили несколько десятков колоний на чашку. Клетки из выросших колоний переносили на чашку с MMD (minimal medium dextrose)-агаром и культивировали чашку 2 дня при 30°C.

Клетки выросших на селективной среде колоний переносили в колбы и культивировали в 5 мл среды MGY на качалке (250 об/мин.) в течение 1 суток до ОП₆₀₀ 5. После этого клетки осаждали центрифугированием при 3000 g 10 мин. Контроль экспрессии целевого гена осуществляли методом SDS-PAGE.

После осаждения клеток питательную среду фильтровали (диаметр пор 45 мкм), затем добавляли Трис-HCl pH 6.0 до конечной концентрации 20 мМ. Среду культивирования, содержащую гибридный белок, концентрировали в 5-10 раз, используя концентраторы для белков с молекулярной массой более 10 кДа фирмы "Millipore".

После концентрирования препарат гибридного белка нагревали на водяной бане до кипения (t=100°C) и кипятили 2 минуты, после чего центрифугировали при 4°C, 15000g 15 минут.

Проводили ионообменную хроматографию на КМ-сефарозе. Колонку с КМ-сефарозой уравнивали буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl pH 6.0. Препарат гибридного белка наносили со скоростью 60 мл/час. Колонку промывали 20 мМ Трис-HCl pH 6.0; 20 мМ Трис-HCl pH 6.0, 200 мМ NaCl. Элюцию проводили 20 мМ Трис-HCl pH 6.0, 1 М NaCl и собирали фракции по 1 мл.

Препарат полученного гибридного белка разбавляли в 2 раза, добавляли фосфат pH 8.0 до концентрации 50 мМ и наносили на колонку. После промывки колонки буфером нанесения балластные белки удаляли промывкой раствором 20 мМ имидазола в том же буфере. Белок элюировали раствором, содержащим 200 мМ имидазола.

В результате был получен препарат гибридного белка с чистотой выше 96%. Выявлено наличие на электрофореграмме полосы, соответствующей по молекулярной массе целевому белку. Для полученного штамма характерен высокий уровень экспрессии целевого белка.

3.2. Получение высокоочищенного гибридного белка с использованием клеток млекопитающих.

На N-конце аминокислотной последовательности гибридного белка поместили сигнальную последовательность TPA (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_000921.1), либо сигнальную последовательность соматотропина (MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA). Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных вариантов гибридного белка в нуклеотидные, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках млекопитающих (CHO) в ручном режиме и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции и последовательность Козак. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Клонировали синтезированные гены в векторе pcDNA3.1(+) по инструкции к вектору. На основе клеток *E.coli* DH10 B/R были созданы штаммы-продуценты данных плазмидных ДНК, по описанному в п.4.1.1. протоколу.

Трансфекцию клеток млекопитающих созданными плазмидами проводили методом кальций-фосфатного осаждения.

Для проведения трансформации клеток млекопитающих (CHO) плазмидными ДНК клетки высевали в 12-и луночные планшеты (Costar, США) с плотностью посева 5×10^4 кл/см². На следующий день для синхронизации клеточных делений культуральную среду заменяли. Через три часа к клеткам добавляли плазмидную ДНК, осажденную фосфатом кальция. Для приготовления осадка 250 мкл раствора, содержащего 50 мкг ДНК в 250 мМ CaCl₂, медленно смешивали с 250 мкл раствора (1,64% NaCl, 1,13% HEPES pH 7,12 и 0,04% Na₂HPO₄). После 24 часов инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂ среду заменяли на аналогичную, содержащую 100 мкг/мл неомицина для селекции клонов, содержащих плазмиды со вставкой целевого гена и, следовательно, экспрессирующих гибридный белок, селекцию проводили в течение 20 суток, в лунках, содержащих живые клетки, меняли среду (при этом предыдущую культуральную среду не выливали, а использовали для определения количества секретируемого белка методом ИФА), а еще через сутки клетки снимали с

подложки и проводили анализ на экспрессию трансформированных генов. Анализ эффективности трансфекции проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL Beckman Coulter (Beckman Coulter, США).

Уровень гибридного белка в культуральной среде полученных стабильных трансфектом линии СНО оценивали с использованием стандартного твердофазного ИФА.

В результате клонирований были получены стабильные трансфектомы СНО, синтезирующие и секретирующие гибридный белок по изобретению. Их накапливали для криоконсервирования и наработки опытной партии гибридного белка. Продуктивность созданных трансфектом СНО составила 430-560 мкг/10⁷ клеток/день.

Культивирование клеток-продуцентов осуществляли с использованием биореактора BIOSTAT® Vplus и автоклавированной среды IMDM с добавлением 45 г DFBS (0,5%) и 25,8 г (100 мМ) сульфата цинка семиводного (ZnSO₄ × 7H₂O) на 9 л среды. Задавали рабочий режим: температура 37°C, pH 6,9-7,2, концентрация кислорода 50% насыщения воздуха. После достижения заданного режима производили засев биореактора, для чего в асептических условиях в него вводили посевной материал. Время культивирования составляло 3 суток.

По окончании культивирования культуральную жидкость фильтровали через стерильную капсулу «Sartopure» («Sartorius», Германия), с диаметром пор 1,2 мкм, со скоростью 1 л/мин. Затем осветленную жидкость концентрировали на системе Viva Flow 200 («Sartorius», Германия) с использованием фильтра. Концентрирование проводили до достижения общего объема - 200 мл.

Хроматографическую очистку проводили в два этапа, с использованием стерильных растворов. На первом этапе использовали систему BioLogic DuoFlow Pathfinder (Bio-Rad) с автоматическим коллектором фракций BioFract и полупрепаративную хроматографическую колонку YMC TriArt, 250x4,6 мм, сорбент C18. Перед началом работы колонку уравнивали с помощью 200 мл буфера (1 кг воды для инъекций и 1 г кислоты трифторуксусной) в ручном режиме через насос хроматографа на скорости 2 мл/мин.

Подготовленный материал в объеме 200 мл вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (2 кг ацетонитрила, 2 г кислоты трифторуксусной) со скоростью 0,5 мл в минуту. Собирали фракцию в максимуме поглощения при 260 нм. Объем фракции составил примерно 500 мл.

Второй этап очистки выполняли с использованием гель-хроматографической колонки BioSil SEC 125-5, 300x7,8 мм. Предварительно колонку уравнивали 0,02 М PBS-буфером. Полученный материал вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (0,6 М раствор NaCl) с градиентом

концентрации от 0,1 до 0,6 М. Собирали фракцию, имеющую поглощение при А280 нм не менее 3.4 оптических единиц. Фракцию собирали во флаконы. Объем получаемого раствора для каждого препарата белка составил примерно 1 л с концентрацией гибридного белка 2-2,7 мг на 1 мл.

Гибридный белок согласно изобретению возможно получить с использованием также других клеток млекопитающих, например, НЕК293, COS.

3.3. Получение высокоочищенного гибридного белка с использованием растений.

Перевели аминокислотную последовательность рассчитанного гибридного белка в нуклеотидную, одновременно проведя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *Nicotiana benthamiana* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген области по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанный ген химически и клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе рTRV1. Возможно использовать и вирусный вектор (например, описанный в статье Комарова Т.В., Скулачев М.В., Зверева А.С., Шварц А.М., Дорохов Ю.Л., Атабеков И.Г. (2006) Новый вирус-вектор для эффективной продукции целевых белков в растениях. Биохимия, 71(8), 1043-1049).

Полученный вектор вводили в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, который использовали для инфильтрации листьев *N. benthamiana*. Полученный штамм *Agrobacterium tumefaciens*, несущий гибридный ген, культивировали в течение 12 ч при 30°C в шейкере. Клетки (1,5 мл) осаждали центрифугированием (4000g, 5 мин), осадок ресуспендировали в буфере (1,5 мл: 10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5.5)), ОП₆₀₀ доводили до 0,2. Наносили суспензию агробактерий шприцом без иглы на листья растущих растений *N. benthamiana*. Наблюдали максимальный уровень синтеза белка на 7-11 сутки после инфильтрации.

Экспрессию гибридного белка в клетках листьев растений-продуцентов анализировали с использованием электрофореза в ПААГ с ДДС Na. Фрагмент листа растирали в буфере (10 mM KCl, 50 mM Трис pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-меркаптоэтанол, 0.4 М сахароза, 10% глицерин) на 10 день после заражения. Полученный экстракт подвергали центрифугированию (14000g, 10 мин), осадок и супернатант анализировали с использованием SDS-ПААГ. На электрофореграмме выявлен белок, соответствующий по молекулярному весу гибриднему белку согласно изобретению, в мембранной фракции клеток. В контроле, растениях, которые не подвергались трансформации, соответствующий белок не выявлен. Выход белка составлял около 11-15% фракции нерастворимых белков.

Исходя из полученных результатов, заявляемый гибридный белок возможно получить с использованием и прокариотических, и эукариотических клеточных систем, высокоочищенный препарат белка можно получить с использованием различных типов очистки белка. Приведенные условия выделения и очистки подбирали экспериментальным путем, они могут варьировать в известных среднему специалисту в этой области значениях.

Пример 4. Получение высокоочищенных генетических конструкций согласно изобретению

На N-конце аминокислотной последовательности гибридного белка поместили сигнальную последовательность TPA (tissue-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_000921.1), либо сигнальную последовательность ГРЧ (MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA). Перевели рассчитанную аминокислотную последовательность гибридного соматотропина в нуклеотидную, одновременно проводя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках млекопитающих с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции и последовательность Козак. Синтезировали рассчитанные гены химически.

4.1. Получение плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок по изобретению (варианты)

4.1.1. Создание штамма-продуцента плазмидной ДНК

Полученные гены помещали в эукариотические экспрессионные вектора pVAX1 (Invitrogen), либо pcDNA3.1+ (Invitrogen) по рестрикционным сайтам, фланкирующим таргетные гены, по инструкции к вектору.

Для создания штамма-продуцента использовали клетки *E.coli* штамма DH10B/R (F-mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80dlacZAM 15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara,leu)769, galU, galK λ -, rpsL, nupG), которые трансформировали полученными плазмидными ДНК методом электропорации с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad). Данный штамм не содержит метилазу, что позволяет минимизировать возможность возникновения мутаций в ДНК, в том числе в клонированном в плазмиде, поддерживаемой в данном штамме, гене. К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл диализованной лигазной смеси, помещали между электродами порационной ячейки и обрабатывали импульсом тока.

После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин при +37°C.

Проводили выявление клонов клеток *E.coli*, содержащих полученную плазмидную ДНК, на селективной среде, содержащей LB-агар, 50 мкг/мл канамицина, либо 100 мкг/мл ампициллина, соответственно.

Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, США). Очищенную рекомбинантную плазмидную ДНК проверяли с помощью секвенирования.

Секвенирование клонированных фрагментов проводили по методу Сэнджера с использованием набора Applied Biosystems BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по прилагающейся к нему инструкции. Для мечения продуктов реакции использовали меченные флуоресцентным красителем ddNTP, причем каждому ddNTP соответствовал свой краситель. Для секвенирования использовали немеченные специфические для плазмид праймеры. Проводили ПЦР-реакцию, затем реакционную смесь очищали от свободных меченых ddNTP по инструкции к набору BigDye X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США), и разделяли продукты реакции секвенирования с использованием капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и реактива 3500/3500xL Genetic Analyzer Polymer “POP-6™” (Applied Biosystems, США).

Результаты деления продуктов реакции секвенирования регистрировали путем сканирования лазером и детекции четырех флуоресцентных красителей, включенных во все типы ddNTP.

Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью персонального компьютера с использованием программ Chromas и BioEdit. Нуклеотидные последовательности исследованных фрагментов ДНК были выровнены относительно рассчитанных, была продемонстрирована идентичность синтезированных фрагментов рассчитанным. В результате были отобраны клоны клеток *E.coli*, содержащие полноразмерные последовательности целевых генов в составе плазмид - последовательности ДНК, кодирующие гибридный белок по изобретению.

4.1.2. Нарботка плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок (варианты)

Отдельную колонию *E.coli*, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением канамицина, либо ампициллина, помещали в 10 мл селективной среды. Клетки растили в течение 12 ч. при +37°C в условиях постоянного перемешивания (250 об/мин.). Полученные клетки собирали центрифугированием при 4000g. Дальнейшее выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), позволяющего получить апирогенную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК

анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле, измеряли ее концентрацию с помощью флуориметрии. Выход плазмидной ДНК составил от 3,9 мг до 5,1 мг из 1 л питательной среды.

4.2. Получение вектора на основе аденоассоциированного вируса, кодирующего гибридный белок по изобретению (варианты)

Полученные гены помещали в вектор на основе аденоассоциированного вируса pAAVK-EF1 α -MCS (System Biosciences (SBI)), на основе которого создавали штамм-продуцент данного вектора, используя клетки *E.coli* (RecA⁻), далее выделяли вектор для использования у млекопитающих, все по инструкции к вектору. Выход вектора составил от 2,2 мг до 3 мг из 1 л питательной среды.

4.3. Получение короткой линейной конструкции, кодирующей гибридный белок по изобретению (варианты)

Для наработки короткой линейной конструкции использовали полученную по п.4.1. плазмидную ДНК. С использованием специфичных праймеров и ПЦР амплифицировали фрагмент плазмидной ДНК, содержащий сигналы инициации транскрипции, промотор, сигналы инициации трансляции, старт-кодон, сигнальную последовательность, гибридный ген, 1 или 2 стоп-кодона, терминирующие транскрипцию последовательности, регуляторные последовательности.

Амплификацию указанной последовательности проводили в объеме 50 мкл, в тонкостенных полипропиленовых пробирках объемом 650 мкл, содержащих 5 мкл 10-кратного буфера Taq (700 mM Трис-HCl, pH 8.6/ 25°C, 166 mM (NH₄)₂SO₄), 5 мкл MgCl₂ (1.25 mM), 1 мкл дНТФ, 31,5 мкл воды, 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймеров, 5 мкл плазмидной ДНК и 0,5 мкл полимеразы Taq (Fermentas, Литва).

Реакционную смесь прогревали 5 мин. при 95°C для денатурации ДНК. Для предотвращения испарения на реакционную смесь объемом 50 мкл наслаивали 30 мкл минерального масла Bayol F (Sigma, США). Реакцию амплификации проводили в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Проводили 35 циклов: 95°C – 20 сек, 50-62°C (в зависимости от праймеров) – 20 сек., 72°C – 1 мин. Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводили дополнительный цикл: 5 мин при 72°C.

Результат ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле. При положительном результате проводили препаративный электрофорез.

Амплифицированные фрагменты ДНК концентрировали и очищали при помощи препаративного электрофореза в 1,2% агарозном геле (Gibco BRL, США). Пробу смеси после проведения ПЦР смешивали с шестикратным буфером (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин) (ThermoScientific, США) и наносили на гель, по 18 мкл в лунку.

Электрофорез проводили в горизонтальном аппарате в буфере TAE (40 мМТрис-ацетат, 2 мМ ЭДТА pH 8,0, 0,5 мкг/мл бромистого этидия) при напряжении 5-10 В/см. Результат разделения ДНК регистрировали в проходящем УФ-свете (302 нм) трансиллюминатора Mascovue (LKB, Швеция). Длину амплифицированного фрагмента определяли по логарифмической зависимости подвижности ДНК от длины фрагментов в маркере. В качестве маркеров использовали фирменную смесь фрагментов ДНК "GeneRuler 1000 bp DNA Ladder"(Fermentas, Литва). Участок агарозы, содержащий полосу ДНК необходимого размера, вырезали, и фрагмент ДНК очищали с помощью набора DNA&Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Великобритания) в соответствии с инструкцией. Использовали выделенную короткую линейную конструкцию у млекопитающих.

Пример 5. Оценка специфической активности полученного препарата (вариантов)

Специфическую активность препарата полученного гибридного белка (вариантов) или генетических конструкций оценивали по ускорению роста клеток линии Nb-2 лимфомы крыс. Клетки выращивали на среде RPMI-1640 с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 10% лошадиной сыворотки, а также 60–100 мкМ 2-меркаптоэтанола. В самом тесте активности рекомбинантного ГРЧ используется среда, не содержащая ни фетальной, ни лошадиной сыворотки. Вместо них используется 10% сыворотки мерина, которая не содержит лактогенных гормонов, также стимулирующих рост клеток Nb-2.

Сравнение проводили с коммерческим препаратом ГРЧ Генотропин (Genotropin®). Методика постановки тестов основана на регистрации кривых зависимости усиления конверсии Аламар Блю от дозы препаратов. Аламар Блю представляет собой нефлуоресцентный краситель резаруцин, который при восстановлении в метаболически-активных клетках превращается в флуоресцентный продукт резоруфин. Падение флуоресценции в присутствии тестируемого вещества отражает уменьшение количества жизнеспособных клеток и используется для измерения цитотоксичности.

В лунки с номерами колонок со 2-ой по 8-ю всех планшетов (Corning) вносили по 100 мкл среды для тестирования 12-канальной пипеткой. Затем в лунки первой и второй колонок вносили по 100 мкл приготовленных разведений препаратов сравнения и исследуемого образца для тестирования. Далее переносили 100 мкл содержимого из второй колонки в третью, и так далее, с шестикратным перемешиванием. Из лунок последней колонки 100 мкл выбрасывали. Далее вносили во все лунки по 100 мкл суспензии клеток.

Через 70 ч роста клеток в лунки вводили по 20 мкл раствора резазурина на 3 ч, затем проводили измерение интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения = 530 нм, длина волны испускания = 590 нм).

Результат: Исследуемый препарат гибридного белка (варианты, полученные по примерам выше) соответствует порядка 90% активности препарата сравнения Генотропина. В том числе такова активность препарата белка, полученного с помощью экспрессии в клетках млекопитающих с разработанной плазмидной ДНК (вариантов), а также с конструкции на основе аденоассоциированного вируса и с линейных генетических конструкторов, с последующей секрецией.

Пример 6. Оценка длительности действия полученного препарата (вариантов)

Фармакокинетические исследования разработанных препаратов проводили на белых мышах неинбредных линий (Питомник лабораторных животных «Рапполово»). Животных, весом 18-22 г, содержали в стандартных условиях, при температуре окружающей среды $+27\pm 2^{\circ}\text{C}$ с постоянной влажностью воздуха 55%, при 12 часовом световом дне, они получали сухой стандартизованный корм и воду без ограничения.

Инъекции осуществляли в виде однократного подкожного (п.к.) введения 100 мкг ГРЧ или пролонгированного соматотропина по изобретению, в физиологическом растворе или PBS, полученного по примерам 2 или 3, либо 50 мкг генетической конструкции, полученной по примеру 4, в физиологическом растворе или PBS, - в квадрицепс задней лапы. Количество мышей составило 40 шт. на группу. На каждую точку было 4 измерения. Образцы крови отбирали в течение 3 дней для оценки релевантных фармакокинетических параметров у животных, которым вводили белок, и в течение 7 дней – которым вводили генетическую конструкцию (варианты). Оценивали предельный период полужизни, время до максимальной концентрации, максимальные уровни концентрации испытуемых веществ в крови, регистрируемые с использованием иммуноанализа при каждом отборе образца.

Уровни концентрации ГРЧ и пролонгированного соматотропина по изобретению в плазме мыши определяли с использованием набора Соматотропный гормон (HGH), EIA1787, ЗАО «ДРГ Техсистемс»).

Выявили, что предельный период полужизни пролонгированного соматотропина по изобретению (11,7 ч) выше, чем таковой ГРЧ (3,23 ч) в исследованной модели на лабораторных мышах, в 3,6 раз. Время до достижения максимальной концентрации было одинаково - составило в случае пролонгированного соматотропина по изобретению и ГРЧ - 1 ч, максимальные уровни концентрации – 1313, 5 нг/мл и 1880,3 нг/мл, соответственно. При этом длительность присутствия белка составила минимум 72 ч (12,5-24,7 нг/мл) и 3 ч (3,1-4,3 нг/мл), соответственно.

В ЕА201490393 не приведено данных по активности, стабильности и периоде полужизни в кровотоке гибридного белка ГРЧ-СТР. В отношении гибридного белка СТР-

ГРЧ-СТР при однократном введении подкожно, у крыс, т.е. иного млекопитающего, период полужизни в кровотоке (8,5 ч) превышал таковой при введении ГРЧ (биотропин) (1,7 ч) в 5 раз. Время до достижения максимальной концентрации для гибридного белка СТР-ГРЧ-СТР-СТР составило 8 ч против 0,5 ч для ГРЧ.

Полагаем, что в связи с вышесказанным (иной организм, отсутствие данных по нескольким параметрам, несколько довесков к соматотропину, фланкирующих) сравнение провести невозможно.

В документе ЕА008505 (29.06.2007), где описаны ПЭГилированные варианты ГРЧ, в опыте с мышами время до достижения максимальной концентрации составляло в случае вариантов 3-12 ч, предельный период полужизни – 2.5-9 ч. Длительность присутствия вариантов белка не указана. Данные по таким показателям ГРЧ не приведены.

Виден разный профиль динамики концентрации с пролонгированными вариантами соматотропина - с СТР-ГРЧ-СТР-СТР и ПЭГилированными вариантами ГРЧ, - но сходный с таковым ГРЧ. В случае ПЭГилированных вариантов ГРЧ предельный период полужизни оказался меньше, чем пролонгированного соматотропина по настоящему изобретению.

При использовании генетических конструкций, полученных по примеру 4, наблюдали синтез разработанного ГРЧ весь период наблюдения, максимальный уровень синтеза достигался на 5 день после введения для плазмид. Наблюдала большую длительность присутствия активного ГРЧ в организме, чем при введении разработанного белка, либо ГРЧ.

Таким образом, использование препарата соматотропина по изобретению (вариантов), либо препарата для его синтеза в целевом организме по изобретению (вариантов) позволяет получить пролонгированное действие гормона роста человека, причем тип динамики концентрации характерен для ГРЧ. Это, в свою очередь, позволит снизить количество действующего вещества при лечении, а также частоту введения препарата. С использованием разработанных препаратов удастся получить пролонгированную продолжительность действия ГРЧ *in vivo* и пролонгированную продолжительность полупериода функционального существования ГРЧ *in vivo*.

Соматотропин пролонгированного действия, полинуклеотид, рекомбинантная клетка, препарат

Формула

1. Соматотропин пролонгированного действия, включающий соматотропин и часть Fc-фрагмента IgG1, модифицированного включением пятикратно последовательно усилителя гидродинамического радиуса, соединенные гибким мостиком, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1.
2. Полинуклеотид, кодирующий соматотропин по п.1, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках продуцента данного белка, либо целевого организма.
3. Генетическая конструкция для синтеза соматотропина по п.1 в клетках продуцента, либо целевого организма, включающая полинуклеотид по п.2 и элементы, позволяющие реализовать указанное назначение.
4. Бактериальная клетка для продукции генетической конструкции по п.3.
5. Рекомбинантная клетка для продукции соматотропина по п.1.
6. Препарат соматотропина пролонгированного действия, содержащий соматотропин по п.1 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор.
7. Препарат для синтеза в целевом организме соматотропина пролонгированного действия, содержащий по меньшей мере одну генетическую конструкцию по п.3 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель или буферный раствор.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201892353

Дата подачи: 14/11/2018

Дата испрашиваемого приоритета:

Название изобретения: СОМАТОТРОПИН ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ, ПОЛИНУКЛЕОТИД, РЕКОМБИНАНТНАЯ КЛЕТКА,
ПРЕПАРАТ

Заявитель: ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ ВЛАДИМИРОВИЧ

☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа).☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: см. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X Y	US8637637B2 (Bill Nai-Chau Sun et al.) 28.01.2014 реферат, формула, SEQ ID NO: 22 весь документ	1 2-7
X Y	WO2005033134A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 14.04.2005, пп. 11, 13, 17, 23, 25 формулы, SEQ ID NO: 30-33 весь документ	1, 2, 6 3-5, 7
X Y	CN102875683A (Jin Yihui et al.) 16.01.2013 реферат, пп. 1-6 формулы весь документ	1, 2 3-7
X Y	EA200600956A1 (АРЕС ТРЕЙДИНГ С.А.) 27.10.2006 пример 1, стр. 97, фиг. 1В весь документ	1 2-7

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи
евразийской заявки или после нее"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспони-
рованию и т.д."Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки,
но после даты испрашиваемого приоритета

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и
приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,

порочающий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска,

порочающий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той

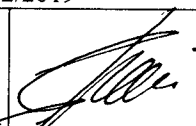
же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 28/02/2019

Уполномоченное лицо:

Ведущий эксперт
Отдела химии и медицины

Е.В. Басевич

Телефон: +7(495)411-61-61*317

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:

201892353

ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	Zhou et al. Single chain Fc-dimer-human growth hormone fusion protein for improved drug delivery. Biomaterials, 2017, 117: 24–31. PMID: 27923197 реферат	1
Y	EA201190326A1 (АМУНИКС ОПЕРЕЙТИНГ ИНК.) 29.06.2012 весь документ, особенно пп. 1, 2, 4, 11 формулы	1–7
Y	Diao, Lin. The molecular design and drug development of recombinant long-acting follicle stimulating hormone. Yao Xue Xue Bao, 2012, 47(4): 421–426. PMID: 22799021 Реферат	1
Y, D	EA008505B1 (ФАРМАЦИЯ КОРПОРЕЙШН) 29.06.2007 весь документ, особенно формула	1
Y, D	RU2539797C2 (НОВО НОРДИСК ХЕЛС КЕА АГ) 27.01.2015 весь документ, особенно пп. 12, 16 формулы	1, 6

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:

201892353

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 38/00 (01/01/2006)
A61K 38/27 (01/01/2006)
A61K 47/68 (01/01/2017)
A61P 5/06 (01/01/2006)
C07K 14/61 (01/01/2006)
C07K 19/00 (01/01/2006)
A61K 38/16 (01/01/2006)
A61K 38/18 (01/01/2006)
A61K 38/22 (01/01/2006)
A61K 39/395 (01/01/2006)
C12N 15/18 (01/01/2006)
A61K 31/7088 (01/01/2006)
C12N 15/62 (01/01/2006)
C12N 15/63 (01/01/2006)
A61K 35/74 (01/01/2015)