

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992516** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.04.09

(51) Int. Cl. *C12P 21/00* (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.20

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

(31) **10-2017-0051758**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.04.21**

**Чои Биунг Хиун, Лим Ин Хван, Парк
Дзун Йоунг, Ли Дзин Хийоунг, Ким Ки
Хонг, Дзо Хае Йонг, Ким Дзун Хван,
Сонг Моо Янг, Ким Дзонг Гиун (KR)**

(33) **KR**

(86) **PCT/KR2018/004599**

(87) **WO 2018/194413 2018.10.25**

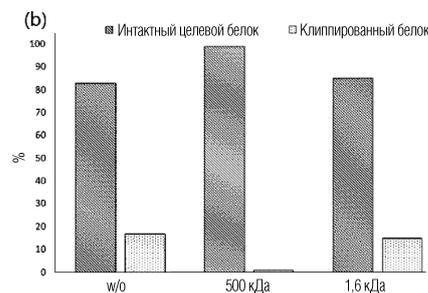
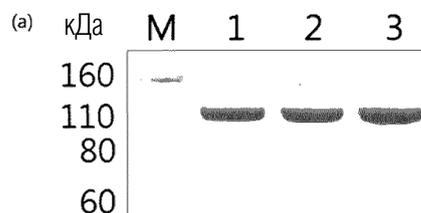
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЮХАН КОРПОРЕЙШН (KR)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения бифункционального белка, включающего биологически активный белок и мутантный белок FGF21. Способ обеспечивает стабильную продукцию целевого белка посредством эффективного предотвращения разложения целевого белка и, таким образом, обладает высоким потенциалом для коммерческого применения.



201992516 A1

201992516 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559583EA/061

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Область техники, к которой относится изобретение

[1] Настоящее изобретение относится к способу получения бифункционального белка, включающего биологически активный белок и мутантный белок фактора роста фибробластов 21 (FGF21).

Уровень техники

[2] Когда животную клетку используют для продуцирования рекомбинантного белка, то может возникнуть проблема, заключающаяся в том, что специфическая область целевого белка может подвергаться клиппингу под действием протеазы, секретируемой животной клеткой (клеткой–хозяином), вызывая гетерогенность, уменьшение или инактивацию рекомбинантного белка. Кроме того, такое клиппинг экспрессированного белка также приводит к проблеме, состоящей в том, что становится трудно поддерживать однородность «от партии к партии» во время процессов получения и очистки. По этой причине необходимо поддерживать протеазы на низком уровне или подавлять протеазную активность во время продуцирования рекомбинантного белка.

[3] В качестве альтернативы для решения этой проблемы был предложен способ получения, в котором в культуральную среду добавляли ингибиторы сериновой протеазы, цистеиновой протеазы, аспаратпротеазы или аминокептидазы (такие как апротинин, бестатин, лейпептин, E–64 и пепстатин А и т. д.) (см. WO 1990–002175, EP 0306968 и патент США 5851800). Однако применение этих ингибиторов в промышленном производстве неэффективно за счет цитотоксичности и необходимости в дополнительных усилиях для подтверждения того, что они были полностью удалены из конечного продукта. Кроме того, среди обычных альтернатив еще не найден универсальный способ, применимый ко всем целевым белкам, продуцируемым в клетках–хозяевах.

[4] Техническая проблема

[5] Целью настоящего изобретения является обеспечение способа культивирования для получения бифункционального белка, включающего биологически активный белок и мутантный белок FGF21, который имеет улучшенные фармакокинетические параметры, высокую стабильность, меньшую вероятность агрегации с образованием комплекса и более низкий иммуногенный потенциал.

[6] Решение проблемы

[7] В соответствии с одной целью настоящего изобретения обеспечивается способ получения рекомбинантного бифункционального белка из клетки–хозяина млекопитающего, трансформированной экспрессионным вектором, содержащим кДНК, кодирующую бифункциональный белок или его производное, где способ включает культивирование клетки–хозяина млекопитающего в культуральной среде с добавлением декстрана сульфата, где бифункциональный белок содержит мутантный белок фактора

роста фибробластов 21 (FGF21); биологически активный белок, или его мутант или фрагмент; и Fc-область иммуноглобулина, где мутантный белок FGF21 содержит, по меньшей мере, одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутаций (1)–(7), приведенных ниже:

[8] (1) замена аминокислот в положениях 98–101 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью EIRP (SEQ ID NO: 53);

[9] (2) замена аминокислот в положениях 170–174 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью TGLEAV (SEQ ID NO: 54);

[10] (3) замена аминокислот в положениях 170–174 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью TGLEAN (SEQ ID NO: 55);

[11] (4) замена аминокислоты в положении 170 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой N;

[12] (5) замена аминокислоты в положении 174 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой N;

[13] (6) замена аминокислоты в положении 180 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой E вместе с одной или более мутациями (1)–(5), приведенными выше; и

[14] (7) мутация 1–10 аминокислот для снижения иммуногенности белка FGF21 дикого типа.

[15]

Преимущественные эффекты изобретения

[16] Способ получения по настоящему изобретению обеспечивает стабильную продукцию целевого белка посредством эффективного предотвращения разложения целевого белка.

[17]

Краткое описание фигур

[18] На фиг.1 представлена схематическая диаграмма, показывающая результаты анализа культурального супернатанта электрофорезом SDS-PAGE после суспензионного культивирования клеточной линии, экспрессирующей бифункциональный белок. Было установлено, что по окончании культивирования другие белки, с меньшей молекулярной массой, чем нерасщепленный бифункциональный белок, экспрессировались вместе.

[19] На фиг.2 представлена схематическая диаграмма, показывающая результаты анализа культурального супернатанта электрофорезом SDS-PAGE в соответствии с температурными условиями хранения после определенного периода времени. Культуральный супернатант, хранившийся при 4°C или –20°C, показал снижение клиппинга бифункциональных белков по сравнению с хранением при 37°C. Этот результат указывает на то, что феномен клиппинга бифункциональных белков индуцируется протеазой, происходящей из клетки-хозяина.

[20] На фиг.3 представлена схематическая диаграмма, показывающая результаты анализа электрофорезом SDS-PAGE после добавления ингибиторов протеаз в

культуральные супернатанты и хранения смесей в течение определенного периода времени при 37°C. Было установлено, что в основном добавление ингибитора сериновой протеазы уменьшало феномен клиппинга бифункционального белка. Этот результат указывает на то, что феномен клиппинга бифункционального белка индуцируется протеазой, происходящей из клетки-хозяина.

[21] На фиг.4 представлены результаты анализа культурального супернатанта электрофорезом SDS-PAGE после культивирования клеток, где в культуральную среду добавляли декстрана сульфат, и их графическое представление. Эффект снижения феномена клиппинга бифункционального белка не наблюдали при добавлении декстрана сульфата, имеющего средневесовую молекулярную массу 1,6 кДа, тогда как феномен клиппинга бифункционального белка уменьшался при добавлении декстрана сульфата, имеющего средневесовую молекулярную массу 500 кДа.

[22] На фиг.5 представлена схематическая диаграмма, показывающая результаты анализа культурального супернатанта электрофорезом SDS-PAGE после культивирования с декстраном сульфатом, имеющим различную средневесовую молекулярную массу, добавленным в культуральную среду. Когда в культуральную среду добавляли декстрана сульфат, имеющий средневесовую молекулярную массу 200 кДа или выше, то феномен клиппинга бифункционального белка снижался.

[23] На фиг.6 представлены результаты анализа электрофорезом SDS-PAGE культурального супернатанта после культивирования, где в культуральную среду добавляли декстрана сульфат в различных концентрациях, и их графическое представление. Когда добавляли декстрана сульфат в концентрации 200–1000 мг/л, то феномен клиппинга бифункционального белка снижался. Кроме того, когда во время культивирования температуру изменяли до 32°C, то феномен клиппинга бифункционального белка можно было предотвращать более эффективно.

[24]

Наилучший способ осуществления изобретения

[25] В соответствии с одной целью настоящего изобретения обеспечен способ получения рекомбинантного бифункционального белка из клетки-хозяина млекопитающего, трансформированной экспрессионным вектором, содержащим кДНК, кодирующую бифункциональный белок или его производное, где способ включает культивирование клетки-хозяина млекопитающего в культуральной среде, с добавлением декстрана сульфата, где бифункциональный белок содержит мутантный белок фактора роста фибробластов 21 (FGF21); биологически активный белок, или его мутант или фрагмент; и Fc-область иммуноглобулина, где мутантный белок FGF21 содержит, по меньшей мере, одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутаций (1)–(7), приведенных ниже:

[26] (1) замена аминокислот в положениях 98–101 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью EIRP (SEQ ID NO: 53) (в дальнейшем «EIRP»);

[27] (2) замена аминокислот в положениях 170–174 от N–конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью TGLEAV (SEQ ID NO: 54) (в дальнейшем «TGLEAV»);

[28] (3) замена аминокислот в положениях 170–174 от N–конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью TGLEAN (SEQ ID NO: 55) (в дальнейшем «TGLEAN»);

[29] (4) замена аминокислоты в положении 170 от N–конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой N (в дальнейшем «G170N»);

[30] (5) замена аминокислоты в положении 174 от N–конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой N (в дальнейшем «G174N»);

[31] (6) замена аминокислоты в положении 180 от N–конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой E вместе с одной или более мутациями (1)–(5), приведенными выше (в дальнейшем «A180E»); и

[32] (7) мутация 1–10 аминокислот для снижения иммуногенности белка FGF21 дикого типа.

[33]

[34] Мутантный белок FGF21

[35] Белок FGF21 дикого типа, гормон, который, как известно, играет важную роль в гомеостазе глюкозы и липидов, может происходить от млекопитающих, таких как люди, мыши, свиньи, обезьяны и т.д., предпочтительно от людей. Более предпочтительно белок FGF21 дикого типа может представлять собой человеческий белок FGF21 дикого типа, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1.

[36] Предпочтительно, мутация, включенная в мутантные белки FGF21, может представлять любую из мутаций EIRP, TGLEAV, TGLEAN, G170N и G174N; комбинацию любой из мутаций TGLEAV, TGLEAN, G170N и G174N и мутацию EIRP; комбинацию любой из мутаций EIRP, TGLEAV, TGLEAN, G170N и G174N и мутацию A180E; или комбинацию любой из мутаций TGLEAV, TGLEAN, G170N и G174N, мутацию EIRP и мутацию A180E.

[37] EIRP относится к мутации, в которой LLLE, аминокислоты в положениях 98–101 от N–конца белка FGF21 дикого типа, замещены EIRP. Кроме того, TGLEAV относится к мутации, в которой GPSQG, аминокислоты в положениях 170–174 от N–конца белка FGF21 дикого типа, замещены TGLEAV. Кроме того, TGLEAN относится к мутации, в которой GPSQG, аминокислоты в положениях 170–174 от N–конца белка FGF21 дикого типа, замещены TGLEAN. Кроме того, G170N относится к мутации, в которой G, аминокислота в положении 170 от N–конца белка FGF21 дикого типа, замещена N. Кроме того, G174N относится к мутации, в которой G, аминокислота в положении 174 от N–конца белка FGF21 дикого типа, замещена N.

[38] Кроме того, мутантные белки FGF21 могут иметь конформацию, в которой 1–10 аминокислот на N–конце или C–конце делецированы по сравнению с белком FGF21 дикого типа. Более предпочтительно, мутантные белки FGF21 могут включать

аминокислотную последовательность, показанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 6–23. Еще более предпочтительно, мутантные белки FGF21 могут включать аминокислотную последовательность, показанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 6–23 и, также имеют конформацию, в которой 1–10 аминокислот на N–конце или C–конце делецированы по сравнению с белком FGF21 дикого типа.

[39] В бифункциональном белке аминокислотный остаток N мутантного белка FGF21, введенного мутацией, может быть гликозилирован.

[40]

[41] Биологически активный белок

[42] Биологически активный белок может быть выбран из группы, состоящей из инсулина, C–пептида, лептина, глюкагона, гастринина, желудочного ингибирующего полипептида (GIP), амилина, кальцитонина, холецистокинина, пептида YY, нейропептида Y, костного морфогенетического белка 6 (BMP–6), костного морфогенетического белка 9 (BMP–9), окситомодулина, окситоцина, глюкагоноподобного пептида–1 (GLP–1), глюкагоноподобного пептида–2 (GLP–2), ирисина, фибронектина типа III, содержащего домен белка 5 (FNDC5), апелина, адипонектина, C1q и белка, связанного с фактором некроза опухолей (семейство TRP), резистина, висфатина, оментина, ретинол-связывающего белка 4 (RBP–4), глицентина, ангиопоэтина, интерлейкина–22 (IL–22), эксендина–4 и гормона роста. Предпочтительно биологически активный белок может быть одним из белков, выбранных из GLP–1, его мутанта и эксендина–4.

[43] Белок GLP–1 представляет гормон инкретин, состоящий из 31 аминокислоты, который секретируется L–клетками в кишечном тракте, стимулированными пищей, и т. д. Например, белок GLP–1 может быть представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29.

[44] Мутант GLP–1 может быть представлен, например, аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 30–33.

[45]

[46] Fc–область иммуноглобулина

[47] Как здесь используется, термин «Fc–область», «Fc–фрагмент» или «Fc» относится к белку, который включает константную область 1 тяжелой цепи (CH1), константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина, но не включает переменные области тяжелой и легкой цепей и константную область 1 легкой цепи (CL1) иммуноглобулина. Кроме того, как здесь используется, термин «мутантная Fc–область» относится к таковой, полученной заменой части аминокислот Fc–области или объединением Fc–областей разных типов.

[48] Fc–область иммуноглобулина может представлять полную Fc–область, входящую в антитело, ее фрагмент или мутантную Fc–область. Кроме того, Fc–область включает молекулу в виде мономера или мультимера и может дополнительно включать шарнирную область константной области тяжелой цепи. Мутантная Fc–область может быть модифицирована для предотвращения расщепления в шарнирной области. Кроме

того, шарнирная последовательность Fc может иметь замену в некоторых аминокислотных последовательностях для снижения антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Кроме того, часть аминокислотной последовательности шарнирной последовательности Fc может быть замещена для ингибирования реаранжировки Fab-области. Остаток лизина на С-конце Fc может быть удален.

[49] Предпочтительно, Fc-область иммуноглобулина может представлять любую из Fc-областей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgD; или гибридную Fc-область, которая является их комбинацией. Кроме того, гибридная Fc-область может включать область IgG4 и область IgD. Кроме того, гибридная Fc-область может включать часть шарнирной последовательности и CH2 IgD Fc, а также последовательности CH2 и CH3 IgG4 Fc.

[50] Кроме того, Fc-фрагмент по настоящему изобретению может находиться в форме гликозилированной цепи дикого типа, более гликозилированной цепи, чем гликозилированная цепь дикого типа, менее гликозилированной цепи, чем гликозилированная цепь дикого типа. Увеличение, уменьшение или удаление гликозилированной цепи может быть выполнено обычным способом, известным в данной области, таким как химический метод, ферментативный метод и метод генной инженерии с использованием микроорганизмов.

[51] Предпочтительно, Fc-область иммуноглобулина может быть представлена аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 24–28.

[52]

[53] Бифункциональный белок

[54] Бифункциональный белок может включать биологически активный белок, Fc-область иммуноглобулина и мутантный белок FGF21, связанные в таком порядке от N-конца к С-концу. Кроме того, бифункциональный белок может включать мутантный белок FGF21, Fc-область иммуноглобулина и биологически активный белок, связанные в таком порядке от N-конца к С-концу. Предпочтительно бифункциональный белок может включать мутантный белок GLP-1, Fc-область иммуноглобулина и мутантный белок FGF21, связанные в таком порядке от N-конца к С-концу. Кроме того, бифункциональный белок может включать мутантный белок FGF21, Fc-область иммуноглобулина и мутантный белок GLP-1, связанные в таком порядке от N-конца к С-концу.

[55]

[56] Линкер

[57] Кроме того, бифункциональный белок может дополнительно включать линкер.

[58] Бифункциональный белок может находиться в форме, в которой мутантный белок FGF21 прямо связан с N-концом или С-концом Fc-области иммуноглобулина, или мутантный белок FGF21 связан с Fc-областью иммуноглобулина через линкер.

[59] В этом случае линкер может быть связан с N-концом, С-концом или свободным радикалом Fc-фрагмента, и также может быть связан с N-концом, С-концом

или свободным радикалом мутантного белка FGF21. Когда линкер представляет пептидный линкер, то соединение может находиться в любой области. Например, линкер может быть связан с С–концом Fc–области иммуноглобулина и N–концом мутантного белка FGF21 с образованием слитого белка Fc–области иммуноглобулина и мутантного белка FGF21. Кроме того, бифункциональный белок по настоящему изобретению может находиться в форме, в которой биологически активный белок связан с N–концом Fc–области иммуноглобулина слитого белка.

[60] Когда линкер и Fc–область экспрессируются по отдельности и затем соединяются, то линкер может представлять сшивающий агент, известный в данной области техники. Примеры сшивающего агента могут включать 1,1–бис(диазоацетил)–2–фенилэтан, глутаральдегид, имидоэфиры, включая сложный эфир N–гидроксисукцинимид, такой как 4–азидосалициловая кислота, и дисукцинимидиловые эфиры, такие как 3,3'–дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис–N–малеимидо–1,8–октан, не ограничиваясь этим.

[61] Кроме того, линкер может представлять пептид. Предпочтительно линкер может представлять пептид, состоящий из 10–30 аминокислотных остатков.

[62] Кроме того, аланин может быть дополнительно присоединен к концу линкера. Предпочтительно, линкер может представлять пептид, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 2–5.

[63] Бифункциональный белок может находиться в форме, в которой димер или мультимер мутантных белков FGF21, где один или более мутантных белков FGF21, связанных друг с другом, соединены с Fc–областью иммуноглобулина. Кроме того, бифункциональный белок может находиться в форме димера или мультимера, где две или более Fc–областей иммуноглобулина связаны, где Fc–области иммуноглобулина имеют мутантный белок FGF21, связанный с ними.

[64]

[65] Клетка–хозяин млекопитающего

[66] Клеткой–хозяином млекопитающего может быть любая клетка животного, способная экспрессировать рекомбинантный бифункциональный белок, предпочтительно клетка животного, которая позволяет легко выделить трансформированную клетку–мишень. В частности, клетки–хозяева млекопитающего могут представлять собой клетки «бессмертной» гибридомы, клетки миеломы NS/0, клетки 293, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки HeLa, клетки CAP (клетки, полученные из амниотической жидкости человека), или клетки COS.

[67]

[68] Декстрана сульфат

[69] В результате добавления ингибитора протеаз к клеточной культуре, продуцирующей бифункциональный белок по настоящему изобретению, эффект предотвращения феномена клиппинга бифункционального белка протеазой, происходящей из клетки–хозяина, был недостаточным.

[70] Декстрана сульфат может иметь средневесовую молекулярную массу от 20 до 5000 кДа. В частности, декстрана сульфат может иметь средневесовую молекулярную массу от 200 до 5000 кДа.

[71] Кроме того, культуральная среда может содержать декстрана сульфат в концентрации от 0,01 до 10 г/л. В частности, культуральная среда может содержать декстрана сульфат в концентрации от 0,1 до 10 г/л или от 0,1 до 1 г/л.

[72]

[73] Культивирование

[74] Культивирование может включать стадию первичного культивирования клетки-хозяина млекопитающего при 34–37°C в культуральной среде, с добавлением декстрана сульфата; и стадию вторичного культивирования первичной культуральной среды при температуре от 28°C до 33°C. В частности, первичное культивирование может проводиться в течение от 24 до 144 ч. Также вторичное культивирование может проводиться при температуре от 31°C до 33°C.

[75] Бифункциональный белок представляет полипептид, в котором варианты GLP-1 и FGF21, биологически активные белки, слиты с Fc-областью иммуноглобулина и экспрессируются в интактной форме при продуцировании культурой клеток животных, и проявляет активность в виде композиции для профилактики или лечения гепатита, фиброза печени и цирроза печени.

[76]

Способ по изобретению

[77] Далее будут подробно описаны примерные варианты осуществления настоящего изобретения со ссылкой на примеры. Однако эти примеры в соответствии с настоящим изобретением могут быть модифицированы во многих различных формах, и объем настоящего изобретения не следует истолковывать как ограниченный примерами, описанными здесь.

[78]

[79]

Примеры

[80] **Пример получения 1. Получение клеток-хозяев для экспрессии бифункциональных белков**

[81] 1-1: Получение экспрессионных векторов для экспрессии бифункциональных белков

[82] Положение, информация о последовательности, цель и ожидаемый эффект каждой мутации, введенной в белок FGF21, приведены в таблице 1 ниже (в таблице 1 N относится к гликозилированному аспарагину (N)). Кроме того, мутантные белки FGF21, включающие мутации, описанные в таблице 1, приведены в таблице 2 ниже.

[83]

Таблица 1

Последовательность	Положение	Исходная последовательность	Мутированная последовательность	Цель	Предполагаемый эффект
EIRP	98–101	LLLE	EIRP	Замена последовательностью FGF19	Повышение стабильности и улучшение фармакокинетики
TGLEAV	170–174	GPSQG	TGLEAV	Замена последовательностью FGF19	Улучшение фармакокинетики
TGLEAN	170–174	GPSQG	TGLEAN	Замена последовательностью FGF19, и добавление N–гликозилирования	Улучшение фармакокинетики
G170N	170	G	<u>N</u>	Точечная мутация, и добавление N–гликозилирования	Улучшение фармакокинетики
G174N	174	G	<u>N</u>	Точечная мутация, и добавление N–гликозилирования	Улучшение фармакокинетики
A180E	180	A	E	Точечная мутация	Улучшение фармакокинетики

[84]

[85]

Таблица 2

SEQ ID NO	Последовательность мутантного белка FGF21
6	FGF21 (EIRP)
7	FGF21 (TGLEAV)
8	FGF21 (TGLEAN)
9	FGF21 (G170N)
10	FGF21 (G174N)
11	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
12	FGF21 (EIRP, TGLEAN)
13	FGF21 (EIRP, G170N)
14	FGF21 (EIRP, G174N)
15	FGF21 (EIRP, A180E)
16	FGF21 (TGLEAV, A180E)
17	FGF21 (TGLEAN, A180E)
18	FGF21 (G170N, A180E)

19	FGF21 (G174N, A180E)
20	FGF21 (EIRP, TGLEAV, A180E)
21	FGF21 (EIRP, TGLEAN, A180E)
22	FGF21 (EIRP, G170N, A180E)
23	FGF21 (EIRP, G174N, A180E)

[86]

[87] Последовательности мутантного белка GLP-1 показаны в таблице 3 ниже, и последовательности слитого белка Fc мутантный GLP-1 показаны в таблице 4.

[88]

Таблица 3

SEQ ID NO	Последовательность мутантного белка GLP-1
30	GLP-1(A2G)
31	GLP-1(GE)
32	GLP-1(GG)
33	GLP-1(GEG)

[89]

Таблица 4

SEQ ID NO	слитый белок Fc мутантный GLP-1
34	DFD52: GLP1(A2G)-HyFc5
35	DFD53: GLP1(A2G)-HyFc40
36	DFD54: GLP1(GE)-HyFc5
37	DFD55: GLP1(GE)-HyFc40
38	DFD56: GLP1(GG)-HyFc5
39	DFD57: GLP1(GG)-HyFc40
40	DFD58: GLP1(GEG)-HyFc5
41	DFD59: GLP1(GEG)-HyFc40

[90]

[91] В таблице 4 HyFc5 представляет SEQ ID NO: 27, и HyFc40 представляет SEQ ID NO: 28.

[92] Кроме того, последовательности бифункциональных белков, включающие мутантные белки GLP-1 и мутантные белки FGF21, приведены в таблице 5 ниже. Каждый бифункциональный белок содержит мутантный белок GLP-1, Fc-область иммуноглобулина, линкер и мутантный белок FGF21, соединенные в таком порядке от N-конца к C-концу.

[93]

[94]

Таблица 5

SEQ ID NO	Код вещества	Последовательность мутантного белка GLP-1	Слитый носитель	Последовательность линкера	Изменения в последовательности и FGF21
43	DFD23	GLP-1(A2G)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
44	DFD24	GLP-1(GE)	hyFc5 (SEQ ID NO: 27)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
45	DFD25	GLP-1(GE)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
46	DFD26	GLP-1(GG)	hyFc5 (SEQ ID NO: 27)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
47	DFD27	GLP-1(GG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
48	DFD28	GLP-1(GEG)	hyFc5 (SEQ ID NO: 27)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
49	DFD29	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21 (EIRP, TGLEAV)
50	DFD69	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV, A180E)
51	DFD112	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV, A180E)
52	DFD114	GLP-1(GEG)	hyFc40 (SEQ ID NO: 28)	GS3 (SEQ ID NO: 4)	FGF21(EIRP, G170N, A180E)

[95]

[96] В частности, нуклеотидные последовательности, кодирующие каждый из бифункциональных белков, были синтезированы после консультации с Bioneer Corporation (Корея) на основе аминокислотной последовательности каждого белка. Последовательности для рестриктаз NheI и NotI добавляли к 5'-концу и 3'-концу нуклеотидных последовательностей, кодирующих каждый из бифункциональных белков, и кодон инициации трансляции белка и лидерную последовательность (SEQ ID NO: 56, MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPSHA), обеспечивающую секрецию экспрессированного белка из клетки вставляли рядом с последовательностью для рестриктазы на 5'-конце. Кодон терминации вставляли за нуклеотидной последовательностью, которая кодирует каждый из мутантных белков FGF21. Нуклеотидную последовательность, кодирующую каждый из бифункциональных белков, клонировали в пустой экспрессионный вектор pTrans с использованием двух рестриктаз NheI и NotI. Пустой экспрессионный вектор pTrans, который имеет промотор CMV, ориджин репликации, полученный из pUC, ориджин репликации, полученный из SV40, и ген резистентности к ампициллину, был приобретен у CEVEC Pharmaceuticals (Германия).

[97]

[98] 1–2: Конструирование плазмидной ДНК для экспрессии бифункциональных белков

[99] E.coli трансформировали каждым из экспрессионных векторов, сконструированных в примере получения 1–1, с целью получения большего количества плазмидной ДНК, которая будет использоваться для экспрессии. Клетки E.coli, с клеточными стенками, которые были ослаблены тепловым шоком, трансформировали каждым экспрессионным вектором, и трансформанты высевали на чашку с агаром LB для получения колоний. Полученные таким образом колонии инокулировали в среду LB, культивировали при 37°C в течение 16 ч, и каждую культуру E.coli, содержащую каждый экспрессионный вектор, получали в объеме 100 мл. Затем полученную E.coli центрифугировали для удаления культуральной среды, и затем добавляли растворы P1, P2, P3 (QIAGEN, Cat No.:12963) для разрушения клеточных стенок с получением таким образом суспензии ДНК, в которой белки и ДНК были разделены. Плазмидную ДНК выделяли из суспензии ДНК, полученной таким образом, с использованием колонки для очистки ДНК Qiagen. Элюированную плазмидную ДНК идентифицировали с использованием электрофореза в агарозном геле, и концентрацию и чистоту измеряли с помощью прибора NanoDrop (Thermo Scientific, NanoDrop Lite). Полученную таким образом ДНК использовали для экспрессии.

[100]

[101] 1–3: Получение трансформированных клеток-хозяев для экспрессии бифункциональных белков

[102] Клетки CHO DG44 (клетки яичника китайского хомячка) трансформировали каждой плазмидной ДНК, выделенной в примере получения 1–2, с использованием

FreeStyleMAX (Invitrogen, Cat. No. 16447–100). Трансформированные клетки яичника китайского хомячка инокулировали в среду (CD OptiCHO, Gibco, кат. № 12681–011) и культивировали в термостате в условиях 8% CO₂ и 37°C для селекции и культивирования выживших клеток с повторными пассажами. Селектированные клетки были окончательно отобраны в виде одного клона методом серийных разведений в 96–луночном планшете.

[103]

[104] Экспериментальный пример 1. Суспензионное культивирование для экспрессии бифункциональных белков и феномен разложения

[105] Клеточную линию CHO, трансформированную материалом с кодом DFD112 (SEQ ID NO: 51) из примера получения 1–3, культивировали в суспензии в среде CD OptiCHO с добавлением 8 mM GlutaMAX (матрас с рабочим объемом 30 мл/125 мл, 37°C, 8% CO₂, 120 об/мин). Затем культуральные супернатанты хранили при трех различных температурных режимах хранения (37°C, 4°C или –20°C) в течение 3 суток, и затем оценивали степень феномена протеолиза с использованием электрофореза SDS–PAGE (4–12% бис–Трис, невосстанавливающие условия) культурального супернатанта. Результаты анализа SDS–PAGE представлены на фиг. 1 и 2.

[106] Как показано на фиг. 1, было установлено, что белки (от 85 до 110 кДа), с меньшей молекулярной массой, чем целевые белки, экспрессировались вместе с целевыми белками, которые не расщеплялись (интактные) во время культивирования клеток для продуцирования бифункциональных белков.

[107] Как показано на фиг. 2, культуральные супернатанты, хранившиеся при 4°C и –20°C, содержали меньше белков небольшого размера, где бифункциональные белки подверглись клиппингу, по сравнению с культуральным супернатантом, хранившимся при 37°C. Следовательно, было установлено, что феномен клиппинга бифункционального белка был вызван протеазами, секретлируемыми из клетки–хозяина, присутствующей в культуральном супернатанте.

[108]

[109] Экспериментальный пример 2. Детектирование ингибиторов протеаз, участвующих в разложении бифункционального белка

[110] Для исследования категории протеаз, участвующих в разложении бифункциональных белков, идентифицированных в экспериментальном примере 1, в культуральные супернатанты из экспериментального примера 1 добавляли различные ингибиторы протеаз и обрабатывали в течение 3 суток при 37°C, которые затем подвергали анализу электрофорезом SDS–PAGE. Ингибиторы протеаз, использованные здесь, показаны в таблице 6, и результаты анализа SDS–PAGE приведены на фиг. 3.

[111]

Таблица 6

Ингибиторы протеаз	Концентрация при обработке
Культуральный супернатант (контроль)	N/A
4–(2–Аминоэтил)бензолсульфонилфторид (AEBSF)	1 mM

Антипаин	0,1 мМ
Бестатин	0,04 мМ
Е-64	0,01 мМ
Динатриевая соль ЭДТА	1 мМ
N-этилмалеимид	1 мМ
Лейпептин	0,1 мМ
Пепстатин	1,46 мМ
Фосфорамидон	0,01 мМ
Бензамидин HCl	4 мМ
ZnCl ₂	10 мМ
Апротинин	0,0008 мМ

[112]

[113] Как показано на фиг.3, было установлено, что феномен разложения бифункционального белка снижался в культуральных супернатантах, обработанных ингибиторами протеаз, связанных с сериновой протеазой, таких как AEBSF, антипаин, лейпептин, бензамидин HCl и апротин. Следовательно, было установлено, что феномен разложения бифункционального белка вызван протеазами, происходящими из клетки-хозяина.

[114]

[115] **Пример 1. Обработка декстраном сульфатом**

[116] Для ингибирования феномена клиппинга, имеющего место во время клеточного культивирования для получения бифункциональных белков, трансформированную клеточную линию CHO из примера получения 1–3 культивировали в суспензии в среде CD Dynamis (Gibco, кат. № A2661501) с добавлением 6 мМ глутамина в течение 7 суток (матрас с рабочим объемом 30 мл/125 мл, 37°C, 8% CO₂, 120 об/мин). В отношении суспензионного культивирования, то в культуральную среду добавляли декстрана сульфат (средневесовая молекулярная масса: 1,6 кДа или 500 кДа) в концентрации 200 мг/л, и культивирование проводили при 32°C низкотемпературной конверсией и методом культивирования с подпиткой. После этого культуральный супернатант анализировали электрофорезом SDS-PAGE (4–12% бис-Трис, невосстанавливающие условия), и результаты анализа SDS-PAGE и их представление в виде схематической диаграммы приведены на фиг. 4. На фиг. 4, w/o и дорожка 1 являются контрольными, 500 кДа и дорожка 2 являются культуральными супернатантами, обработанными декстраном сульфатом с 500 кДа, и 1,6 кДа и дорожка 3 являются культуральными супернатантами, обработанными декстраном сульфатом с 1,6 кДа.

[117] Как показано на фиг.4, было установлено, что феномен клиппинга бифункционального белка эффективно ингибировался, когда в культуральную среду добавляли декстрана сульфат со средневесовой молекулярной массой 500 кДа.

[118]

[119] **Пример 2. Влияние декстрана сульфата в зависимости от молекулярной массы**

[120] Исследовали диапазон эффективных концентраций добавляемого декстрана

сульфата, защитный эффект которого в отношении феномена клиппинга бифункционального белка во время культивирования клеток, был установлен в примере 1.

[121] В частности, культивирование проводили в тех же условиях, что и в примере 1, за исключением изменения средневесовой молекулярной массы (1,6 кДа, 8 кДа или 200 кДа) и концентрации (100 мг/л, 200 мг/л или 500 мг/л) добавленного декстрана сульфата. После этого культуральный супернатант анализировали с использованием электрофореза SDS-PAGE (4–12% бис-Трис, невозстанавливающие условия), и результаты анализа SDS-PAGE и их графическое представление приведены на фиг. 5.

[122] Как показано на фиг.5, феномен клиппинга бифункционального белка значительно снижался, когда в культуральную среду добавляли декстрана сульфата, имеющий молекулярную массу 200 кДа или выше, в концентрации от 100 до 500 мг/л.

[123]

[124] Пример 3. Оценка условий культивирования для предотвращения разложения бифункционального белка

[125] Исследовали условия культивирования для получения максимального эффекта предотвращения клиппинга бифункциональных белков декстраном сульфатом, идентифицированным в примерах 1 и 2.

[126] В частности, культивирование проводили в тех же условиях, что и в примере 1, за исключением того, что декстрана сульфат с 500 кДа добавляли в концентрации от 0 мг/л до 1000 мг/л. В данный пример была включена экспериментальная группа, в которой температуру культивирования изменяли на 32°C на сутки 4 культивирования (см. таблицу 7 ниже). Затем культуральный супернатант анализировали электрофорезом SDS-PAGE (4–12% бис-Трис, невозстанавливающие условия), и результаты анализа SDS-PAGE и их график представлены на фиг. 6.

[127]

Таблица 7

Дорожка	Концентрация добавленного декстрана сульфата	Условия культивирования
1	0	Культивирование при 32°C в течение 3 суток после культивирования при 37°C в течение 4 суток
2		Культивирование при 37°C в течение 7 суток
3	200 мг/д	Культивирование при 32°C в течение 3 суток после культивирования при 37°C в течение 4 суток
4		Культивирование при 37°C в течение 7 суток
5	600 мг/л	Культивирование при 32°C в течение 3 суток после культивирования при 37°C в течение 4 суток
6		Культивирование при 37°C в течение 7 суток
7	1000 мг/л	Культивирование при 32°C в течение 3 суток после культивирования при 37°C в течение 4 суток
8		Культивирование при 37°C в течение 7 суток

[128]

[129] Как показано на фиг.6, было установлено, что культуральные супернатанты культуры с обработкой декстраном сульфатом, имеющим средневзвешенную молекулярную массу 500 кДа, показали значительно более сниженный феномен клиппинга бифункционального белка по сравнению с культуральными супернатантами культуры без обработки декстраном сульфатом. Кроме того, было установлено, что при изменении температуры во время культивирования феномен клиппинга бифункционального белка ингибировался более эффективно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения рекомбинантного бифункционального белка из клетки-хозяина млекопитающего, трансформированной экспрессионным вектором, содержащим кДНК, кодирующую бифункциональный белок или его производное, где способ включает культивирование клетки-хозяина млекопитающего в культуральной среде с добавлением декстрана сульфата, где бифункциональный белок содержит мутантный белок фактора роста фибробластов 21 (FGF21); биологически активный белок, или его мутант или фрагмент; и Fc-область иммуноглобулина, где мутантный белок FGF21 содержит, по меньшей мере, одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутаций (1)–(7), приведенных ниже:

(1) замена аминокислот в положениях 98–101 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью EIRP (SEQ ID NO: 53);

(2) замена аминокислот в положениях 170–174 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью TGLEAV (SEQ ID NO: 54);

(3) замена аминокислот в положениях 170–174 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотной последовательностью TGLEAN (SEQ ID NO: 55);

(4) замена аминокислоты в положении 170 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой N;

(5) замена аминокислоты в положении 174 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой N;

(6) замена аминокислоты в положении 180 от N-конца белка FGF21 дикого типа аминокислотой E вместе с одной или более мутациями (1)–(5), приведенными выше; и

(7) мутация 1–10 аминокислот для снижения иммуногенности белка FGF21 дикого типа.

2. Способ по п.1, где биологически активный белок выбран из группы, состоящей из инсулина, С-пептида, лептина, глюкагона, гастринина, желудочного ингибирующего полипептида (GIP), амилина, кальцитонина, холецистокинина, пептида YY, нейропептида Y, костного морфогенетического белка 6 (BMP-6), костного морфогенетического белка 9 (BMP-9), оксинтомодулина, окситоцина, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2), ирисина, фибронектина типа III, содержащего домен белка 5 (FNDC5), апелина, адипонектина, C1q и белка, связанного с фактором некроза опухолей (семейство STRP), резистина, висфатина, оментина, ретинол-связывающего белка 4 (RBP-4), глицентина, ангиопоэтина, интерлейкина-22 (IL-22), эксендина-4 и гормона роста.

3. Способ по п.1, где бифункциональный белок может включать биологически активный белок, Fc-область иммуноглобулина и мутантный белок FGF21, связанные в таком порядке от N-конца к C-концу.

4. Способ по п.1, где декстран сульфат имеет среднemasсовую молекулярную массу от 20 до 5000 кДа.

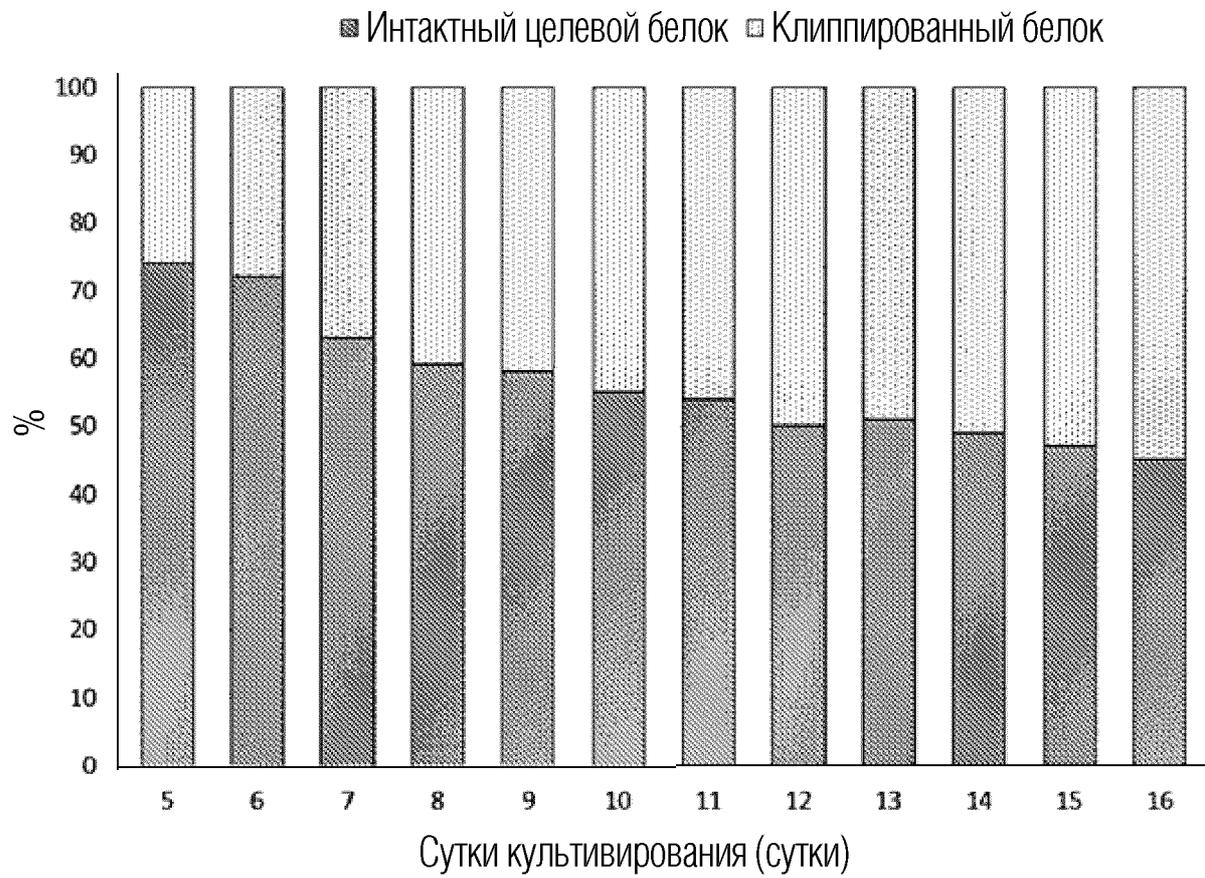
5. Способ по п.1, где культуральная среда содержит декстран сульфат в

концентрации от 0,01 до 10 г/л.

6. Способ по п.1, где культивирование включает:
стадию первичного культивирования клетки–хозяина млекопитающего при 34–37°C в культуральной среде с добавлением декстрана сульфата; и
стадию вторичного культивирования первичной культуральной среды при 28–33°C.
7. Способ по п.6, где первичное культивирование проводят в течение от 24 до 144 ч.
8. Способ по п.1, где вторичное культивирование проводят при температуре от 31°C до 33°C.

По доверенности

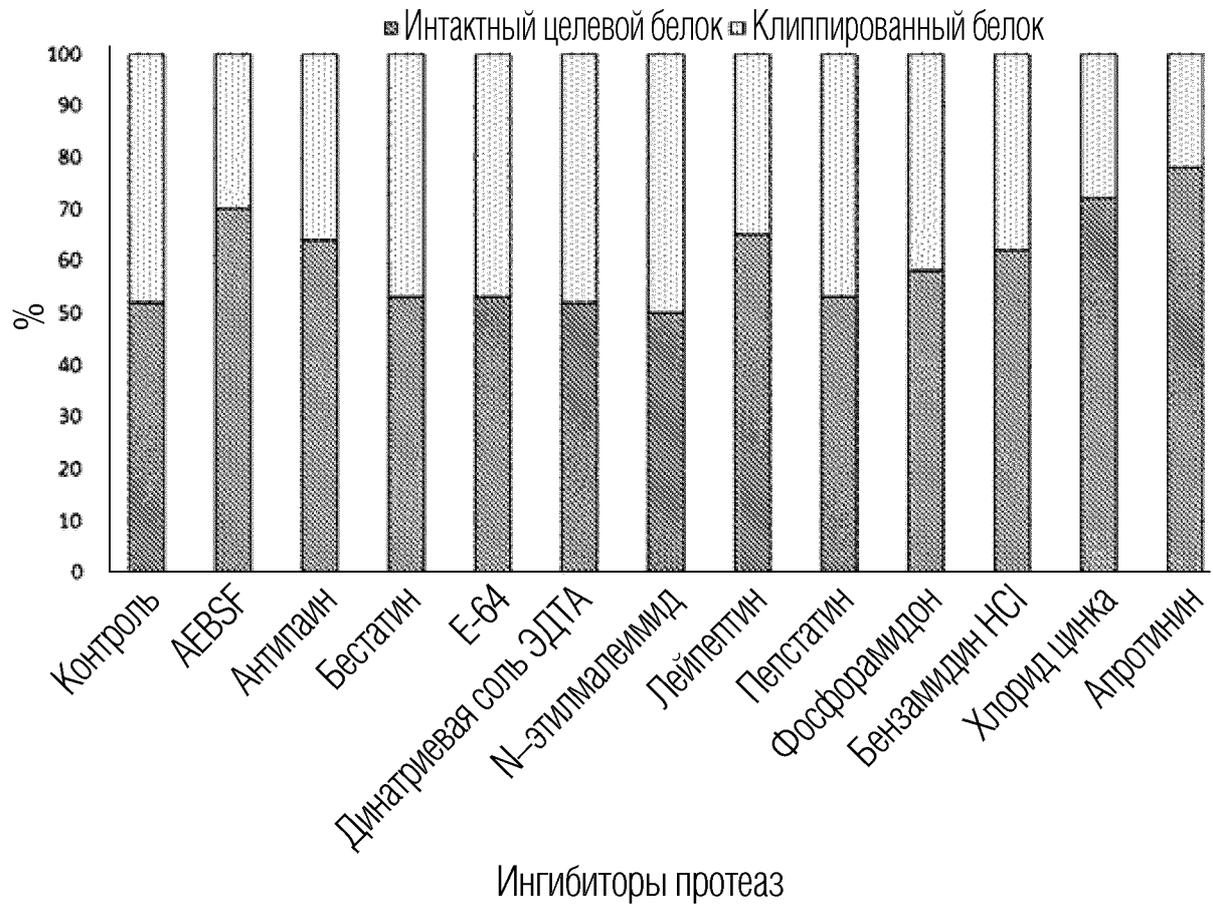
ФИГ. 1



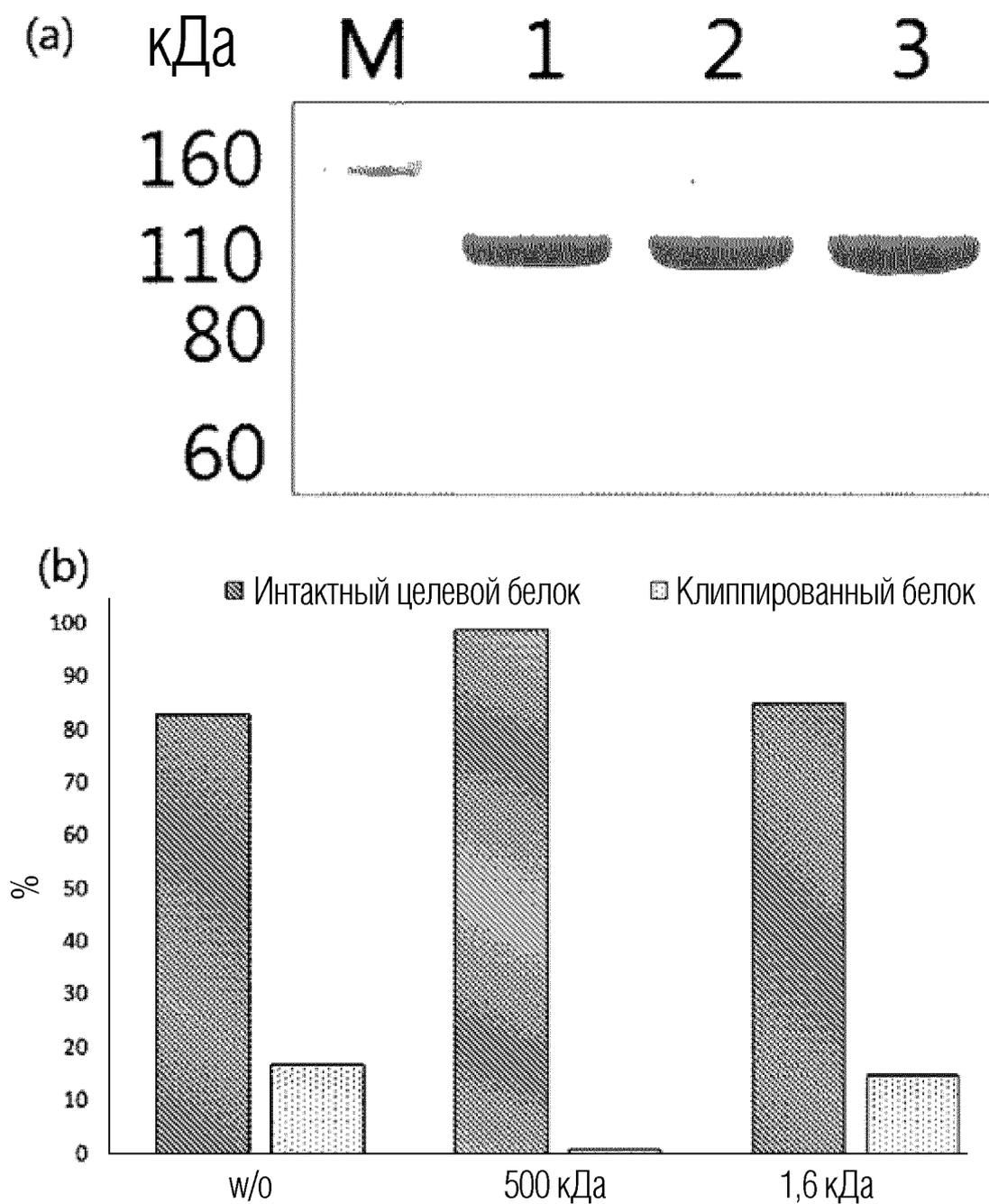
ФИГ. 2



ФИГ. 3

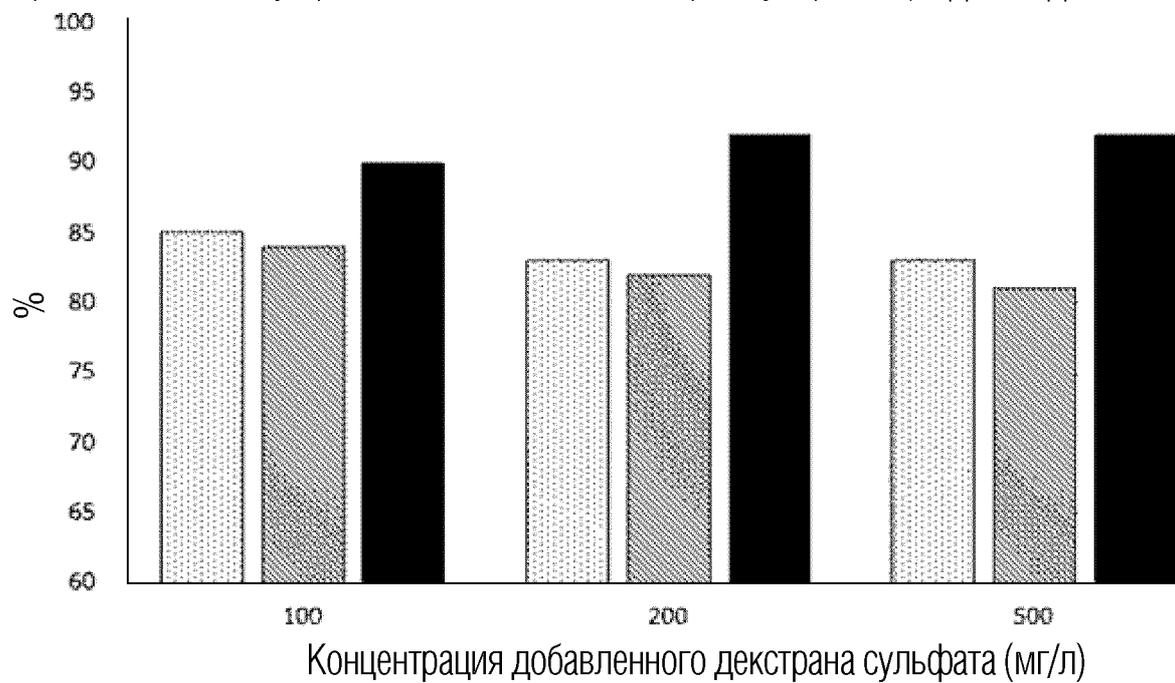


ФИГ. 4



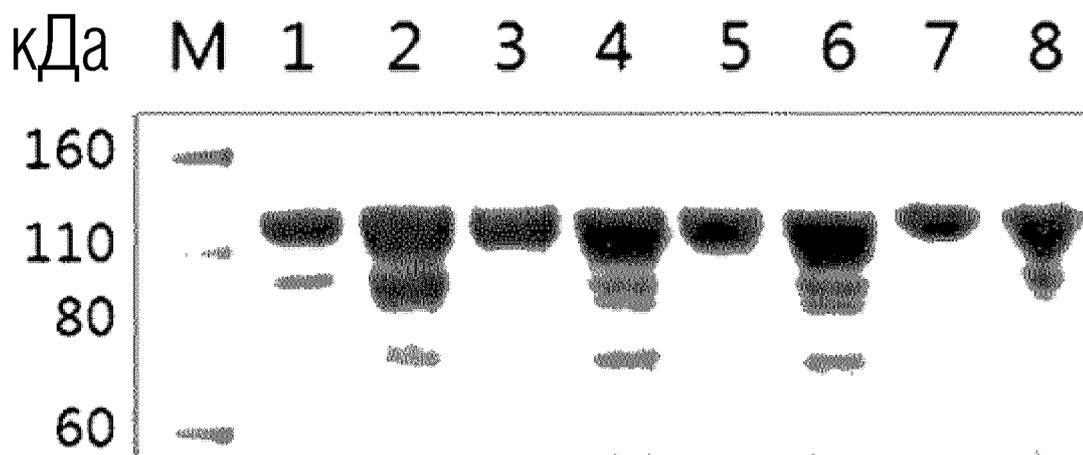
ФИГ. 5

Средневесовая молекулярная масса добавленного декстрана сульфата □ 1,6 кДа ▨ 8 кДа ■ 200 кДа



ФИГ. 6

(a)



(b)

