

## Лекция 14

### Тема 14. Биотехнология получения гормональных препаратов.

Инсулин. Источники получения. Рекомбинантный инсулин человека. Конструирование плазмид. Выбор штамма микроорганизма. Выбор лидирующей последовательности аминокислот. Отщепление лидирующих последовательностей. Методы выделения и очистки полупродуктов. Сборка цепей. Ферментативный гидролиз проинсулина. Альтернативный путь получения рекомбинантного инсулина; синтез А- и В-цепей в разных культурах микробных клеток. Проблема освобождения рекомбинантного инсулина от эндотоксинов микроорганизмов-продуцентов. Биотехнологическое производство рекомбинантного инсулина. Экономические аспекты. Инсулиноподобные факторы роста (И ФР-1, И ФР-П). Белковые трансмембранные рецепторы факторов роста. Терапевтическое значение пептидных факторов роста.

Гормон роста человека. Механизм биологической активности и перспективы применения в медицинской практике. Микробиологический синтез. Конструирование продуцентов.

Эритропоэтин. Механизм биологической активности. Применение в медицинской практике. Получение рекомбинантного человеческого эритропоэтина. Конструирование продуцентов. Методы очистки и обеспечение безопасности.

Традиционные источники получения стероидных гормонов. Проблемы трансформации стероидных структур. Преимущества биотрансформации перед химической трансформацией. Штаммы микроорганизмов, обладающие способностью к трансформации (биоконверсии) стероидов. Конкретные реакции биоконверсии стероидов. Микробиологический синтез и получение путем биоконверсии преднизолона.

#### ***14.1 Разработка методов генетической инженерии изменила структуру и содержание современной промышленной микробиологии.***

Во-первых, значительно возросла продуктивность микроорганизмов, используемых для синтеза биологически активных веществ (сайт-специфический мутагенез в области регуляторных элементов генов, амплификация генов, введение в геном новых кодирующих последовательностей и т. п.).

Во-вторых, появилась возможность менять питательные потребности продуцентов, придавать им устойчивость к определенным факторам окружающей среды, повышать их конкурентоспособность, скорость роста и др.

Наконец, изменилась сама логика промышленной микробиологии: ранее для обнаруженного вновь продуцента какого-либо метаболита создавались методы и средства его биотехнологической эксплуатации, теперь появилась возможность воспользоваться только геном или группой генов нового штамма и перенести их в адаптированный для производства соответствующей категории веществ, хорошо изученный микроорганизм.

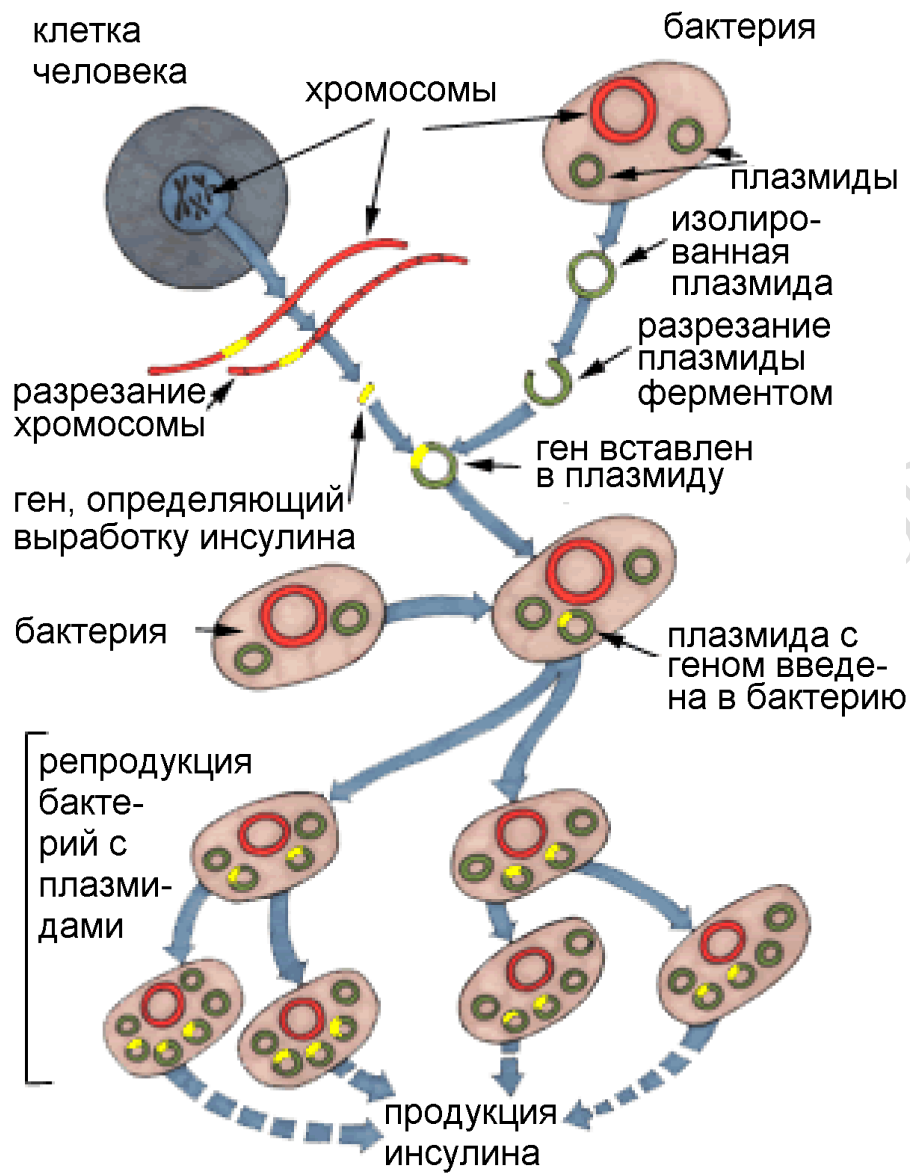


Рис. 3. Схема получения инсулина методом бактериального синтеза

## **14.2. Получение человеческого инсулина.**

Инсулин представляет собой гормон, секретируемый клетками поджелудочной железы в кровь и участвующий в углеводном обмене. Процесс синтеза инсулина в клетках осуществляется в ходе нескольких стадий: вначале на рибосомах образуется препроинсулин, который содержит сигнальный пептид, направляющий пептидную цепь внутрь эндоплазматического ретикулума. Там отщепляется сигнальный пептид и замыкаются дисульфидные мостики – формируется проинсулин. Последний поступает в аппарат Гольджи и депонируется в клеточных везикулах, где в ходе отщепления С-пептида (33 аминокислотных остатка) образуется зрелый инсулин. Молекулы зрелого инсулина состоят из А- и В-цепей, соединенных дисульфидными мостиками.

Чистый инсулин необходим в большом количестве для лечения диабета. До недавнего времени гормон приходилось получать дорогостоящим и трудоемким способом из поджелудочной железы животных. Этот инсулин вызывал ответную реакцию – образование антител.

**ИНСУЛИН.** Инсулин синтезируется клетками островков Лангерганса поджелудочной железы; 70% мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют именно этот белок.

Человеческий инсулин - полипептид с м.м. 5808, состоящий из 51-й аминокислоты, которые образуют две соединенные дисульфидными мостиками полипептидные цепи (одна цепь состоит из 21 аминокислоты, так называемая цепь А; другая - из 30 аминокислотных остатков, так называемая цепь В). Аминокислотный состав цепей видоспецифичен. Предшественник инсулина продуцируется внутри клеток посредством ДНК- и РНК-управляемого синтеза. Длинная цепь проинсулина в аппарате Гольджи упаковывается в гранулы, где в результате гидролиза удаляются четыре аминокислоты с образованием инсулина и связывающего пигмента, называемого С-пептидом. Инсулин и С-пептид в эквивалентных концентрациях секретируются в ответ на все стимуляторы секреции инсулина (глюкозу, маннозу и некоторые аминокислоты - лейцин, аргинин). Выделяется также небольшое количество нативного или частично гидролизованного проинсулина, который оказывает некоторое гипогликемическое действие. В гранулах клеток инсулин депонируется в виде кристаллов, состоящих из двух атомов цинка и шести молекул инсулина. В целом, человеческая поджелудочная железа содержит до 8 мг инсулина, что составляет приблизительно 200 биологических «единиц» (количество единиц определяют по массе препарата; существующий инсулиновый стандарт, используемый в аналитических целях, составляет 28 ЕД/мг).

Инсулин обладает мощным действием, охватывающим биосинтез нуклеиновых кислот, белков, обмен углеводов, липидов, продукцию высокоэнергетических соединений. Инсулин регулирует углеводный обмен, усиливает усвоение тканями глюкозы и способствует превращению ее в гликоген, облегчает проникновение глюкозы в клетки тканей. Будучи специфическим средством терапии сахарного диабета, инсулин снижает гипергликемию и глюкозурию, пополняет депо гликогена в мышцах и печени, уменьшает образование глюкозы, снимает диабетическую липемию, улучшает общее состояние больного. Единственное отличие больного человека от здорового в том, что здоровые получают этот гормон благодаря собственной поджелудочной железе, больные – из рук Государства.

Сахарным диабетом 1 типа - инсулинзависимым диабетом (ИЗСД) официально больны свыше 3 млн российских граждан, «неофициально» - до 10 млн. Известно, что ИЗСД (тяжелая форма, при отсутствии лечения приводящая к кетозу), наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями занимает одно из ведущих мест по медико-социальной значимости и является причиной ранней инвалидности и высокой смертности. Диабет II типа - инсулиннезависимый (ИНЗСД) включает более легкие формы диабета. Диабетом этого типа чаще болеют тучные люди.

История открытия инсулина связана с именем русского врача И.М. Соболева (вторая половина 19 в.), доказавшего, что уровень сахара в крови человека регулируется специальным гормоном поджелудочной железы.

В 1922 г. инсулин, выделенный из поджелудочной железы животного, был впервые введен 10-летнему мальчику (Торонто), больному диабетом. Результат превзошел все ожидания, и уже через год выпустили первый препарат животного инсулина. Поджелудочная железа крупного рогатого скота (КРС) и свиней поставляется бойнями, где опытный персонал по разработанной методике извлекает железы из туш, их быстро замораживают (оптимальная температура - 70°C) и в вагонах-рефрижераторах направляют на фармацевтические предприятия, где экстрагируют гормон. Масса поджелудочной железы КРС составляет в среднем 200-250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 1000-1200 кг исходного сырья. Бычий (говяжий) гормон, в отличие от свиного, обладает несколько большей антигенностью для человека. После получения первой промышленной партии инсулина в последующие несколько лет пройден огромный путь его выделения и очистки, в результате гормон стал доступен для лечения больных сахарным диабетом 1 типа, для адекватного контроля уровня глюкозы в крови инсулин нужно было вводить подкожно 4 раза в сутки.

В 1935 г. датский исследователь Хагедорн оптимизировал действие инсулина в организме, предложив пролонгированный препарат протамин-цинк-инсулин (вводили один раз в сутки).

Первые кристаллы инсулина были получены в 1952 г.; развитие методов очистки гормона (иммуноэлектрофорез) от других гормональных веществ (глюкагона - антагониста инсулина и соматостатина, последний подавляет выделение инсулина и глюкагона) и продуктов деградации инсулина позволили получить гомогенный инсулин, называемый однокомпонентным.

В 1954 г. английский биохимик Г. Сенджер получил Нобелевскую премию за расшифровку структуры инсулина.

Синтез обеих цепей инсулина и соединение их дисульфидными связями был проведён в 1963-1965 гг. В начале 70-х гг. советскими учёными А. Юдаевым и С. Швачкиным был предложен химический синтез инсулина. Осуществить в промышленном масштабе столь дорогостоящими и сложный синтез полипептидного гормона, состоящего из десятков аминокислотных остатков, нерентабельно, в том числе и по причине малого выхода.

В 70-е гг. 20 в. шло прогрессирующее улучшение степени очистки инсулинов, что уменьшило проблемы, обусловленные инсулиновой аллергией, нарушениями работы почек, расстройством зрения и иммунной резистентностью к инсулину. Со времени открытия и до начала 80-х гг. использовали инсулин, получаемый из поджелудочной железы КРС и свиней. Инсулин КРС отличается тремя аминокислотами, свиной – одной аминокислотой от инсулина человека. Наиболее эффективный гормон для заместительной терапии при сахарном диабете – гомологичный инсулин, т.е. инсулин человека.

В 1980 г. датская фармацевтическая компания «Novo» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека ферментативным замещением аланина, последний является 30-й аминокислотой в цепи В, на остаток треонина с последующей хроматографической очисткой продукта, в результате был получен однокомпонентный инсулин человека 99% чистоты.

Достижения молекулярной биологии позволили установить, что биосинтез инсулина в клетках островковой ткани происходит по следующим основным этапам:

закодированная информация о структуре гормона содержится в инсулиновом гене (участок ДНК) 11-й хромосомы;

в результате стимулирующего действия, прежде всего глюкозы и некоторых других веществ, эта информация списывается РНК-полимеразой с инсулинового гена в виде мРНК на рибосомах, в которых осуществляется соединение аминокислот с образованием белков. На рибосомах происходит сборка полипептидной цепи из 109 аминокислот с образованием препроинсулина под влиянием рестриктаз, в результате образуются фрагменты от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов;

при синтезе препроинсулина в клетках поджелудочной железы первые 23 аминокислоты «проводят» молекулу через мембрану клетки. Эти аминокислоты отщепляются рестриктазами и образуется пептид проинсулин, состоящий из 86 аминокислот. Молекула проинсулина сворачивается таким образом, что начальный и конечный её сегменты сближаются, а центральная часть молекулы удаляется под влиянием ферментов рестрикции; роль центральной части сводится к правильному взаимному расположению двух цепей инсулина.

В Великобритании с помощью *E. coli* синтезированы обе цепи человеческого инсулина, которые затем были соединены в молекулу биологически активного гормона. Чтобы одноклеточный организм мог синтезировать на своих рибосомах молекулы инсулина, необходимо снабдить его нужной программой, т.е. ввести ему ген гормона. Химическим способом (операцию проводят специалисты биохимики) получают ген, программирующий биосинтез предшественника инсулина или два гена, программирующие в отдельности биосинтез цепей А и В инсулина. Следующий этап - включение гена предшественника инсулина (или гены цепей инсулина порознь) в геном *E. coli* - особого штамма кишечной палочки, выращенного в лабораторных условиях; эту задачу выполняет генная инженерия. Из *E. coli* вычленивают плазмиду соответствующей рестриктазой. Синтетический ген встраивается в плазмиду (клонированием с функционально активной С-концевой частью  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*). В результате *E. coli* приобретает способность синтезировать белковую цепь, состоящую из  $\beta$ -галактозидазы и инсулина. Синтезированные полипептиды отщепляют от фермента химическим путём, затем проводят их очистку. В бактериях синтезируется около 100000 молекул инсулина на бактериальную клетку.

Природа гормонального вещества, продуцируемого *E. coli*, обусловлена тем, какой ген встраивается в геном одноклеточного организма. Если клонирован ген предшественника инсулина, бактерия синтезирует предшественник инсулина, который подвергается затем обработке рестриктазами для отщепления препептида с вычлениением С-пептида, вследствие чего получается биологически активный инсулин. Для получения очищенного инсулина человека выделенный из биомассы гибридный белок подвергают химико-ферментативной трансформации и соответствующей хроматографической очистке (фронтальной, гель-проникающей, анионообменной).

В Институте биоорганической химии РАН получен рекомбинантный инсулин с использованием генно-инженерных штаммов *E. coli*.

В настоящее время генно-инженерный инсулин производят путем ферментации генетически измененных микроорганизмов: кишечной палочки или дрожжей, которые способны синтезировать предшественник инсулина (проинсулин) в составе химерного протеина. Из полученного биосинтетическим путем промежуточного продукта реконструируют инсулин человека (энзиматическим путем) по следующей схеме: культивирование штамма со встроенным геном гибридного белка, включающим полную последовательность инсулина человека; очистка и денатурация гибридного белка; протеолитическое расщепление гибридного белка с получением инсулина; очистка инсулина. Данная схема во многом напоминает процесс биосинтеза инсулина в островках Лангерганса, где гормон сначала появляется в виде белка-предшественника (проинсулина), а потом протеолитическими ферментами от проинсулина отщепляется соединительный С-пептид. В производстве для расщепления гибридного белка используют сходные по специфичности ферменты: трипсин и карбоксипептидазу В. Гидролиз производят путем обработки ферментами последовательно или одновременно.

Примером получения рекомбинантного инсулина является технология, предложенная российскими учеными из ОАО «Национальные биотехнологии», Института биоорганической химии РАН и Государственного института кровезаменителей и медицинских препаратов. Ими был создан штамм-продуцент гибридного белка *E. coli* JM109/pPINS07.

На рис. 16 представлена биотехнологическая схема получения рекомбинантного инсулина.



Рисунок 16 - Биотехнологическая схема получения рекомбинантного инсулина



Из выращенной биомассы выделяется предшественник, гибридный белок, экспрессируемый в количестве 40% от всего клеточного белка, содержащий препроинсулин. Превращение его в инсулин *in vitro* осуществляется в той же последовательности, что и *in vivo* - отщепляется лидирующий полипептид, препроинсулин превращается в инсулин через стадии окислительного сульфитолиза с последующим восстановительным замыканием трёх дисульфидных связей и ферментативным вычленением связывающего С-пептида. После ряда хроматографических очисток, включающих ионообменные, гелевые, получают человеческий инсулин высокой чистоты и природной активности.

Использование аффинной хроматографии значительно снизило содержание в препарате загрязняющих белков с более высокой М.м., чем у инсулина. К таким белкам относятся проинсулин и частично расщепленные проинсулины, которые способны индуцировать выработку антиинсулиновых антител. Стандартизация инсулина по загрязнению классифицирует препараты на обычные, содержащие проинсулина более 1 %, монопиковые - менее 0,3% п, улучшенные монопиковые - менее 0,005% и монокомпонентные, содержащие менее 0,001% проинсулина. Использование человеческого инсулина с самого начала терапии сводит к минимуму возникновение аллергических реакций. Наиболее частые осложнения инсулиновой терапии - гипогликемические состояния, основными признаками избытка инсулина являются нарушения функции ЦНС (спутанность сознания, странное поведение, кома).

В массовом производстве человеческого инсулина использует технологию рекомбинантных ДНК, помещая к ДНК гена человеческого проинсулина в *E. coli* или *S. cerevisiae* и гидролизую наработанный проинсулин до молекулы инсулина. Человеческие инсулины этой фирмы носят название «Хумулин». В медицинской практике используют рекомбинатные человеческие инсулины из серии Хумулин - регулярный, НПХ, ленте, ультраленте и их комбинированные составы. Человеческий инсулин быстрее абсорбируется и независимо от формы препарата имеет более короткую длительность действия, чем животные инсулины. Человеческие инсулины менее иммуногенны, чем свиные, особенно смешанные бычьи и свиные инсулины.

В молекуле инсулина обнаружены области, играющие повышенную роль в его физико-химических и биологических свойствах. При внесении мутационных изменений в аминокислотную последовательность этих областей, существенным образом изменяются свойства молекулы в целом. Удалось получить аналоги с модификацией В-цепи, что привело к значительному увеличению гормональной активности по сравнению с природным инсулином.

Контроль качества генно-инженерного инсулина предполагает контроль дополнительных показателей, характеризующих стабильность рекомбинантного штамма и плазмиды, отсутствие постороннего генетического материала в препарате, идентичность экспрессируемого гена и др. (всего 22 показателя).

***В настоящее время в медицинской практике используют инсулины трех типов:***

- короткодействующие с быстрым началом эффекта;
- средней продолжительности действия;
- длительного действия с медленным проявлением эффекта.

Инсулин короткого действия - регулярный инсулин - представляет собой короткодействующий растворимый при нейтральном значении pH кристаллический цинк-инсулин, эффект которого развивается в течение 15 мин после подкожного введения и продолжается 5-7 ч.

С целью увеличения длительности действия все другие препараты инсулина модифицированы и при растворении в нейтральной среде образуют суспензию. Они содержат протамин в фосфатном буфере - протамин-цинк-инсулин и НПХ (нейтральный протамин Хагедорна) - НПХ-инсулин или различные концентрации цинка в ацетатном буфере - инсулины ультраленте, ленте, семиленте.

Препараты инсулина средней длительности действия содержат протамин, представляющий белок средней м.м. 4400, богатый аргинином и получаемый из молок радужной форели. Для образования комплекса требуется соотношение протамина и инсулина 1:10. После подкожного введения протеолитические ферменты разрушают протамин, позволяя инсулину всасываться.

НПХ-инсулин не изменяет фармакокинетический профиль смешиваемого с ним регулярного инсулина. НПХ-инсулин предпочтительнее инсулина ленте в качестве компонента средней длительности действия в терапевтических смесях, содержащих регулярный инсулин.

В фосфатном буфере все инсулины (свиной, бычий, человеческий) легко образуют кристаллы с цинком, но только кристаллы бычьего инсулина обладают достаточной гидрофобностью, чтобы обеспечить замедленное и стабильное высвобождение инсулина, характерного для ультраленте. Цинковые кристаллы свиного инсулина растворяются быстрее, эффект наступает раньше, длительность действия короче. Поэтому не существует препарата ультраленте, содержащего только свиной инсулин. Монокомпонентный свиной инсулин выпускают под названием инсулин-суспензия, инсулан-нейтрал, инсулин-изофан, инсулин-аминохинурид.

Инсулин ленте - это смесь 30% инсулина семиленте (аморфный преципитат инсулина с ионами цинка в ацетатном буфере, эффект которого развивается относительно быстро) с 70% инсулина ультраленте (плохо растворимый кристаллический цинк-инсулин, имеющий замедленное начало и пролонгированное действие). Эти два компонента обеспечивают комбинацию с относительно быстрой абсорбцией и стабильным длительным действием, делая инсулинленте удобным терапевтическим средством.

При введении инсулина в виде аэрозоля на слизистую оболочку носа эффективный уровень препарата в плазме достигается быстро, однако, длительное интраназальное введение инсулина оказывает токсическое действие на слизистую оболочку.

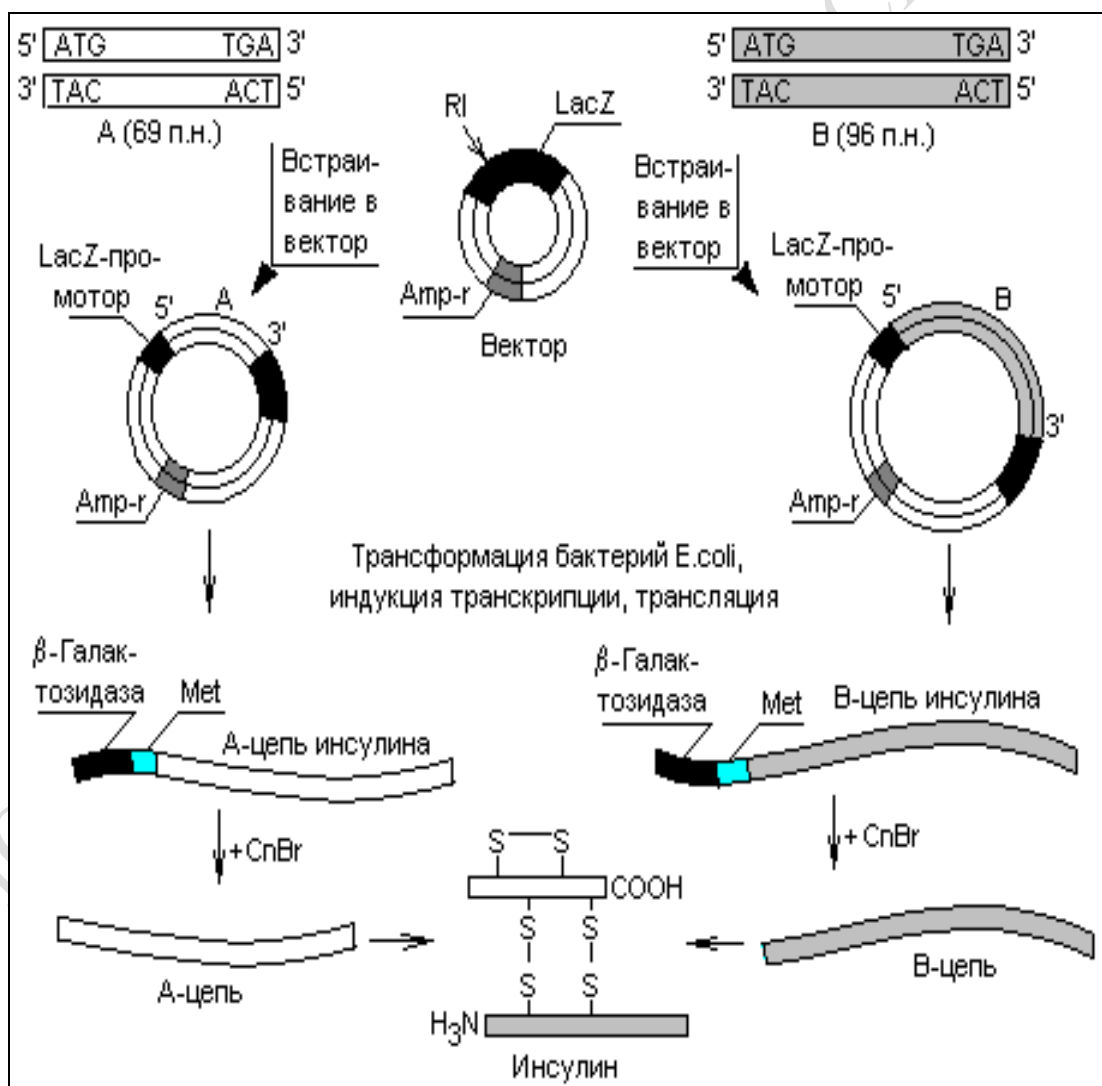


Рис. 4.5. Схема процесса образования человеческого инсулина бактериями *E. coli*:  
RI – рестриктаза типа I; CnBr – цианогенбромид

В настоящее время инсулин человека получают с помощью сверхсинтеза бактериями, сконструированными методами генетической инженерии. Инсулин стал первым коммерческим генноинженерным продуктом, продуцируемым бактериями, разрешенным к широкому применению в терапии диабета.

Ген инсулина млекопитающих содержит интрон, поэтому для клонирования нельзя было использовать сам ген, т. к. бактерии не способны к сплайсингу. Оставалось две возможности – использовать кДНК, полученную копированием проинсулиновой мРНК, либо синтезировать кодирующие последовательности химическим путем. На самом деле осуществлены оба эксперимента, при этом клонирование в бактериях проинсулиновой кДНК приводило к образованию предшественника гормона, который не мог превратиться в клетках *E. coli* в зрелый инсулин, поскольку в них не осуществляется необходимый специфический посттрансляционный процессинг. Для получения инсулина нужна была дополнительная стадия ферментативного расщепления проинсулина *in vitro*. В другом, более результативном эксперименте нуклеотидные последовательности, кодирующие *A*- и *B*-цепи инсулина, синтезировали химически. Для этого вначале определили последовательность аминокислот в *A*- и *B*-цепях инсулина и предсказали последовательность нуклеотидов во фрагментах ДНК на основании генетического кода.

*A*-фрагмент содержал 69 п. н.: 60 п. н. – кодирующая часть, плюс стартовый (ATG) и терминирующий (TGA) кодоны. Фрагмент *B* содержал 96 п. н. (рис. 4.5).

Стартовые метиониновые кодоны вводили в состав фрагментов гена инсулина для того, чтобы можно было отделить цепи инсулина от прокариотических аминокислотных последовательностей (*N*-участок  $\beta$ -галактозидазы).

Для экспрессии клонированных генов инсулина в клетках кишечной палочки осуществляли встраивание каждого синтезированного фрагмента в плазмидный вектор под контроль  $\beta$ -галактозидазного промотора. Данный регуляторный элемент выбран неслучайно. Уже упоминалось, что эукариотические белки, накапливаясь в клетках прокариот в больших количествах, тормозят их рост в основном из-за токсичности, а также деградируются протеазами.

В таких случаях полезным может оказаться выращивание бактериальных клеток до высокой плотности, после чего их индуцируют к синтезу продукта.

Известно, что лактозный оперон *E. coli* регулируется по типу индукции, т. е. инкубирование клеток с рекомбинантными ДНК в отсутствие индуктора позволяет им быстро достичь необходимой плотности популяции (инсулиновые гены не транскрибируются), а когда в культуральную жидкость вносят индуктор (изопропилтиогактозид), клетки начинают массово синтезировать цепи инсулина.

Итак, компетентные клетки *E. coli* трансформировали гибридными векторами и отбирали потомство на среде с ампициллином (рис. 4.5). В трансформированных бактериях синтезировались предшественники *A*- и *B*-цепей инсулина. С помощью цианогенбромида, разрушающего метионин и с меньшей эффективностью триптофан, от предшественников отщепляли короткий  $\beta$ -галактозидный участок вместе с одним остатком метионина (эти белки не содержат других остатков метионина и триптофана).

После очистки *A*- и *B*-цепи смешивали в условиях, способствующих образованию прочных бисульфидных связей, в результате чего получался чистый человеческий инсулин.

Трансформация бактерий *E. coli*, индукция транскрипции, трансляция  $\beta$ -Галактозидаза  $\beta$ -Галак-тозидаза *LacZ*-про- *A*-цепь мотор *LacZ*-про- мотор *B*-цепь *B*-цепь инсулина  
*A*-цепь инсулина *A* (69 п. н.) *B* (69 п. н.) *LacZ A B*

### 14.3. Эритропоэтин

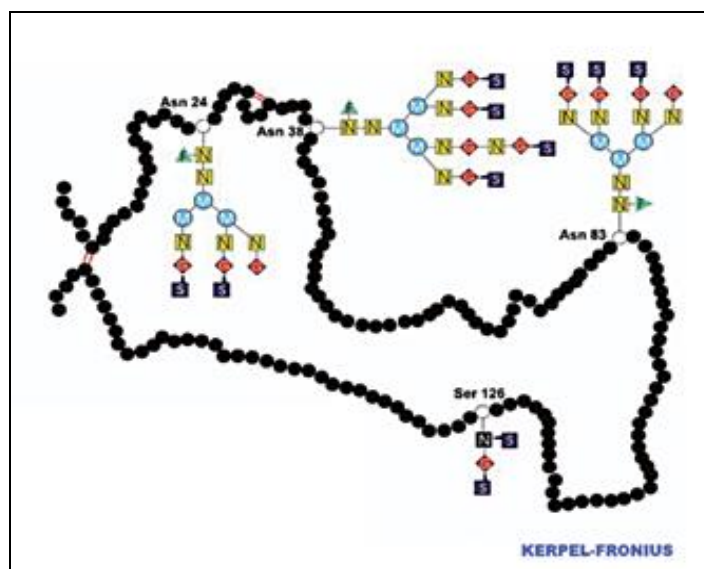
**Эритропоэтин (гемопоэтин)** (тж. [англ. erythropoietin](#), *EPO*) — один из [гормонов почек](#) (также секретируется в перисинусоидальных клетках печени), который контролирует [эритропоэз](#), то есть образование красных кровяных клеток (эритроцитов). По химическому строению является [гликопротеином](#). Используется как лечебное средство<sup>[↔]</sup>. В спорте является допингом<sup>[↔]</sup>. Вес человеческой EPO ~ 34 кДа.

Экзогенный эритропоэтин вырабатывается при помощи молекулярного клонирования в клеточной культуре.

Многие заболевания и патологические состояния сопровождаются снижением количества эритроцитов и, соответственно, гемоглобина, что приводит к снижению “кислородной ёмкости крови” и развитию симптоматической анемии. Одной из причин данного вида анемии является снижение или полное прекращение синтеза эритропоэтина. Снижение синтеза эритропоэтина развивается на фоне таких тяжелых состояний, как опухолевый процесс, почечная недостаточность, СПИД и др. Лечение анемии у больных с данной патологией возможно с использованием только двух методов – гемотрансфузия (переливание крови) или введение в организм аналога эритропоэтина. В организме эритропоэтин синтезируется в мизерных количествах, поэтому единственным методом получения эндогенного аналога эритропоэтина является генно-инженерная технология с использованием рекомбинантной ДНК. Развитие биотехнологии, в первую очередь методов генной инженерии и высокой степени очистки биопрепаратов, позволило значительно увеличить количество и номенклатуру рекомбинантных эпоэтинов. Однако, нормативные требования для оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований препаратов рекомбинантных эритропоэтинов отсутствуют. В данной работе представлен обзор основных показателей качества, которые необходимо учитывать при разработке унифицированных требований при оценке качества, безопасности и эффективности на этапах разработки, проведения доклинических и клинических исследований и регистрации препаратов рекомбинантных эпоэтинов.

Эритропоэтин является гликопротеином и относится к группе цитокинов I класса (семейство факторов гемопоэтических клеток), поддерживающих жизнеспособность и пролиферацию кроветворных клеток.

Являясь основным регулятором эритропоэза, эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов из поздних клеток-предшественников и повышает выход ретикулоцитов из костного мозга [1].



**Рис. 1. Структура молекулы эритропоэтина.** А – двумерная модель молекулы эритропоэтина: “=” – дисульфидная связь, М – манноза, G – галактоза, • – аминокислоты, N – ацетилглюкозамин, N – ацетилгалактозамин.  
Б – пространственная модель молекулы эритропоэтина.

### Основные виды рекомбинантных эритропоэтинов

Эритропоэтин является первым цитокином, который был клонирован и получен в виде рекомбинантного белка. Эритропоэтин, полученный с использованием клеток насекомых (с вектором на основе бакуловируса), имел молекулярную массу 23 кДа и сниженное количество углеводных цепочек. В системе *in vitro* биологическая активность данного эритропоэтина соответствовала нативному, однако в исследованиях *in vivo* была установлена его более низкая биологическая активность. Бактериальная система синтеза рекомбинантного эритропоэтина не позволила получить гликопротеин, в котором гликозилирование соответствует (или подобно) нативному эритропоэтину [8]. Известно, что бактериальная клетка имеет систему гликозилирования, принципиально отличающуюся от эукариотической. Препарат, синтезированный в системе клеток *Escherichia coli*, распознавался антителами против эритропоэтина и имел молекулярную массу, соответствующую дегликозилированному эритропоэтину.

Наиболее удачными явились исследования Lin F.K с соавт. [9], которые первыми получили эритропоэтин в культуре клеток линии СНО (эпителиоподобные клетки из яичника китайского хомячка). Для этого была использована плаزمид, которая содержала ген эритропоэтина человека под контролем промотора поздних генов вируса SV40.

Для получения следующего рекомбинантного эритропоэтина использована линия клеток из почки хомячка (ВНК), в которые встраивали две плазмиды, одна из которых содержала ген эритропоэтина человека, другая – ген гидрофолатредуктазы.

Разработка технологии получения rHuEPOs на основе клеток линии СНО позволила начать промышленный выпуск лекарственных препаратов на основе рекомбинантных эритропоэтинов. Вопрос о том, какие критерии должны быть положены в основу при определении МНН рекомбинантным эритропоэтинам, рассматривались в 1989, 2009 и 2010 международной группой ВОЗ (Consultation on International Nonproprietary Names), которая ежегодно рассматривает вопросы, связанные с присвоением МНН лекарственным средствам. При появлении первых рекомбинантных эритропоэтинов было мало информации об их физико-химических и биологических свойствах. В дальнейшем, с появлением новых препаратов, стало понятно, что препараты рекомбинантных эритропоэтинов различаются между собой по степени гликозилирования. Практически невозможно в разных производственных условиях получить абсолютно идентичные препараты, даже при сходстве аминокислотной цепочки они будут отличаться по качественным и количественным характеристикам полисахаридных цепочек. Поэтому было принято решение о том, что для определения МНН рекомбинантных препаратов эритропоэтинов будет использоваться корень – *poetin*, а приставка (префикс) будет определяться в зависимости от того, имеется или нет изменение аминокислотной цепочки. При неизменной аминокислотной последовательности добавляется “э” (“e” в английском варианте) – эпоэтин. Для препаратов, которые имеют модифицированную последовательность аминокислот присоединяется другой префикс (например, дарбэпоэтин). В настоящее время известны девять видов эпоэтинов (альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, каппа, омега, тета и дзета). К основному наименованию добавляется буква греческого алфавита, которая характеризует особенности гликозилирования, фактически это отражает разработку нового производственного процесса получения рекомбинантного эпоэтина.

Препараты рекомбинантных эритропоэтинов, зарегистрированные органами контроля стран ЕС (EMA), США (FDA) и Российской Федерации, включенные в государственный реестр лекарственных средств РФ, представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Зарегистрированные лекарственные препараты рекомбинантных эритропоэтинов в Российской Федерации, странах ЕС, США**

МНН	Торговое наименование		
	РФ	Страны ЕС (EMA)	США (FDA)
Epoetin alfa	Эпрекс Эпокомб Бинокрит Эпокрин Аэприн	Abseamed Binocrit Epoetin	Erogen
Epoetin beta	Рекормон Эпостим Эритроestim Эритропоэтин Веро-Эпоэтин	NeoRecormon	
Epoetin theta		Biopoin Eporatio	
Epoetin zeta		Retacrit Silapo	
Darbepoetin alfa	Аранесп	Aranesp	Aranesp
Methoxipoly-ethyleneglycol epoetin beta	Мирцера	Mircera	Mircera

Американская компания «Amgen», разработав биотехнологию получения эпоэтина альфа в системе клеток CHO, получила патент на препарат Erogen, после продажи патента компании «Johnson & Johnson», последняя начала выпускать препарат с наименованием Procrit для США и наименованием Eprex для других стран. Эпоэтин бета, синтезируемый клетками CHO, был разработан двумя фирмами «Roche» и «Chugai» и поступил на рынки под торговыми наименованиями NeoRecormon (Ф. «Roche») и Erogen (Ф. «Chugai»).

Следующим rHuEPO является препарат эпоэтин омега, для синтеза которого были использованы клетки почки хомячка. Права на препарат Eromax приобрела фирма «Baxter», которая не стала дальше развивать препарат.

Европейские фирмы «Transkaryotic» и «Aventis» разработали технологию получения препарата Дунеро (эпоэтин дельта), который синтезируется опухолевыми клетками фибросаркомы человека (HT-1080). Среди всех рекомбинантных препаратов, эпоэтин дельта имеет наибольшее сходство с нативным эритропоэтином, в нем также не содержится N-гликолилнейраминная кислота. Препарат выпускался около года и затем по коммерческим причинам его выпуск был прекращен.



В настоящее время фирма «Sanofi-Aventis» готовится к выпуску препарата ДунЕро (эритропоэтин сигма), также синтезируемого клетками фибросаркомы человека (HT-1080).

К воспроизведенным препаратам эпоэтина альфа относится разработанный «Japan Chemical Research Pharmaceuticals Co.» и одобренный Японским национальным органом контроля как препарат эпоэтин каппа. В странах ЕС разработаны и зарегистрированы воспроизведенные препараты эпоэтина альфа: Binocrit («Sandoz»), Epoetin alfa Hexal («Hexal Biotech»), Abseamed («Medice Arzneimittel») и препараты эпоэтина зета: Silapo («Stada») и Retacrit («Hospira») [10].

В Российской Федерации, по данным реестра лекарственных средств Министерства здравоохранения, разработаны и выпускаются препараты эпоэтина альфа (ГосНИИ ОЧБ) и эпоэтина бета («Фармапарк», «Микроген», «Биннофарм», «Лэнс-Фарм» и ЗАО МТХ).

Рядом зарубежных фирм разработаны новые лекарственные препараты эритропоэтинов, характеризующиеся более высокой эффективностью. Одним из путей повышения эффективности rHuEPOs является увеличение времени циркуляции в крови препарата за счет образования прочной связи активного центра эпоэтина с соответствующим рецептором на клетках, что позволяет ему многократно активировать рецептор к эритропоэтину. Этого можно достичь путем использования одного из двух подходов – за счет увеличения молекулярной массы самого rHuEPO или в результате его полимеризации. Фирма «Amgen» разработала препарат Дарбэпоэтин (эпоэтин альфа), в котором к аминокислотной цепочке присоединены 2 дополнительные углеводные N-цепочки в положении Asn30 и Asn88. В результате этого, количество сиаловых остатков увеличилось до 22, доля углеводного компонента повысилась до 52% молекулярной массы, которая составила 37,1 кДа.

Компания «Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.» разработала препарат Mircera, в котором молекула эпоэтина бета присоединена к метоксиполиэтиленгликолю. Данная комбинация позволила повысить молекулярную массу до 60 кДа, при этом полимеризация rHuEPO вызвала снижение сродства активного центра эритропоэтина к соответствующему рецептору на клетках [6].

### **14.3.1. Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к технологии получения с использованием методов генетической инженерии гибридных белков человеческого эритропоэтина (ЭПО), обладающих высокой биологической активностью и пролонгированным действием.**

ЭПО является фактором роста и терминальной дифференцировки предшественников эритроцитов в костном мозге.

Синтез эритропоэтина - гормона, регулирующего образование эритроцитов, происходит в почках. Циркулирующий в кровеносной системе ЭПО связывается со специфическими рецепторами клеток-предшественников эритроцитов, вызывая их пролиферацию и дифференциацию. При ряде патологий, особенно при заболеваниях почек, синтез эндогенного ЭПО существенно снижается, что приводит к развитию тяжелых анемических состояний. Введение рекомбинантного ЭПО позволяет эффективно восстанавливать процесс образования эритроцитов, нормализуя тем самым состояние пациентов. В то же время, известно, что ЭПО, как и другие гликопротеины плазмы, быстро подвергается энзиматической деградации, лишаясь сиаловых кислот, что приводит к короткому времени циркуляции в организме и необходимости частого введения белка для достижения максимального клинического эффекта (*J. Pharmacology and Exp. Therapeutics*: 327, 2, 308-315; *British J. of Cancer*: 84, Supp.1, 3-10, 2001). Известны несколько стратегий повышения стабильности ЭПО *in vivo*, обусловленных двумя механизмами элиминации (выведения) ЭПО из организма. Это либо увеличение размеров молекулы ЭПО за счет введения дополнительных лигандов, что приводит к снижению почечного клиренса (скорости выведения ЭПО из организма (*J. Biol. Chem*: 263, 15064-15070, 1988)), либо введение в молекулу ЭПО дополнительных углеводных цепей, что приводит к большему числу сиаловых групп и снижает уровень элиминации ЭПО через экспрессируемые в клетках печени (гепатоцитах) рецепторы для асиалированных белков - ASGR (*American J. Physiology*: 227, 6, 1385-1388).

Молекула ЭПО имеет четыре карбогидратных цепи, три из которых связаны с пептидной цепью через азот аспарагина (N-гликозилирование), а одна - через кислород серина (O-гликозилирование). При этом гликолизильные цепи составляют около 40% от молекулярного веса молекулы (*British J. of Cancer*: 84, Supp.1, 3-10, 2001). Каждая из трех N-углеводных цепей состоит из 2-4 ветвей. Для O-углеводных цепей характерно наличие 1-2 ветвей. Каждая из углеводных цепей может завершаться остатком сиаловой кислоты.

Максимальное количество сиаловых кислот в молекуле ЭПО равно 14, что придает всей молекуле ЭПО отрицательный заряд, лишает ее возможности связаться с ASGR-рецепторами гепатоцитов и, соответственно, увеличивает время циркуляции в организме.

Как показано при создании коммерческого препарата на основе ЭПО "Aranesp" компании Amgen, введение в молекулу ЭПО двух дополнительных сайтов N-гликозилирования увеличивает время выведения гормона из организма в 3-4 раза (Exp. Hematology: 31, 290-299, 2003; US 7,217,689 B1).

Для получения белка пролонгированного действия -  $\alpha$ -дарбэпоэтина использована технология генетической модификации белковой структуры ЭПО. Молекула модифицированного ЭПО ( $\alpha$ -дарбэпоэтина) содержит 5 замен в аминокислотной последовательности, две из которых - замена аланина в позиции 30 и триптофана в позиции 88 на аспарагин являются дополнительными сайтами N-гликозилирования. Высокая степень гликозилирования обеспечивает  $\alpha$ -дарбэпоэтину пролонгированную биологическую активность и клинический эффект даже при сниженной в два раза, по сравнению с ЭПО, способности к аффинному взаимодействию со специфическим рецептором (US 7,217,689 B1; British J. of Cancer: 84, supp.1, 3-10, 2001).

При создании гибридного белка ЭПО-(СТР)<sub>3</sub>, который является ближайшим аналогом заявляемых белков рекомбинантного ЭПО с пролонгированным действием, показано, что введение в молекулу ЭПО дополнительных сайтов O-гликозилирования также увеличивает время циркуляции гормона в организме (US 20070190610 A1). В состав гибридного белка ЭПО-(СТР)<sub>3</sub> входят три C-концевых пептида  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека (СТР), каждый из которых содержит по четыре сайта O-гликозилирования (Intern. J. Cell Biology: 2011, ID 275063; US 20070190610 A1). Два СТР пептида расположены на C-конце молекулы ЭПО и один - на N-конце (US 20070190610 A1). Таким образом гибридный белок ЭПО-(СТР)<sub>3</sub> имеет в отличие от ЭПО 12 дополнительных сайтов O-гликозилирования, что обеспечивает снижение клиренса и увеличение времени циркуляции ЭПО-содержащего белка в организме, по сравнению с ЭПО. При этом время полувыведения белка для ЭПО-(СТР)<sub>3</sub> близко к аналогичному параметру  $\alpha$ -дарбэпоэтина, а аффинность взаимодействия с ЭПО-рецептором не снижена.

**Задача заявляемой группы изобретений** - расширить арсенал белков на основе рекомбинантного эритропоэтина человека, обладающих пролонгированным действием, и разработать способ получения таких белков.

### ***Поставленная задача решена путем получения***

- гибридного белка EPO-TR 1,6, обладающего пролонгированным действием, соответствующего аминокислотной последовательности SEQ ID NO 4 и представляющего собой рекомбинантный эритропоэтин человека, слитый с фрагментом TR 1,6 белка MUC 1 человека;

- гибридного белка EPO-TR 4, обладающего пролонгированным действием, соответствующего аминокислотной последовательности SEQ ID NO 5 и представляющего собой рекомбинантный эритропоэтин человека, слитый с фрагментом TR 4 белка MUC1 человека;

- гибридного белка EPO-TR 6, обладающего пролонгированным действием, соответствующего аминокислотной последовательности SEQ ID NO 6 и представляющего собой рекомбинантный эритропоэтин человека, слитый с фрагментом TR 6 белка MUC 1 человека и

- разработки способа получения гибридного белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 путем роллерного культивирования в подходящих условиях модифицированной линии клеток млекопитающих CHO, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO 1 или SEQ ID NO 2 или SEQ ID NO 3 с последующим выделением гибридного белка из культуральной жидкости.

Заявляемые белки характеризуются тем, что не имеют лигандов на N-концевом участке молекулы ЭПО, а для создания дополнительных сайтов O-гликозилирования у заявляемых белков в качестве лиганда молекулы ЭПО использован фрагмент человеческого гликопептида MUC 1. Этот фрагмент представляет собой наиболее гликозилированный в молекуле MUC 1 пептидный участок (VNTR), состоящий из 20-120 повторов пептида TR. Каждый такой пептид TR состоит из 20 аминокислот и содержит пять потенциальных сайтов O-гликозилирования (Oncogene: 29, 20, 2893-2904, 2010; Glycobiology: 15 (2), 177-191, 2005). Заявляемые белки EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 и EPO-TR 6 представляют собой ЭПО, слитый с фрагментами TR разной длины (1,6; 4 и 6, соответственно) на C-концевом участке молекулы ЭПО.

## Этапы конструирования штаммов-продуцентов

*Конструирование штаммов-продуцентов состоит из следующих этапов:*

1. Получение генетических конструкций для экспрессии заявляемого белка ЕРО-TR 1,6 методом перекрывающейся полимеразной цепной реакции (SOE-PCR) с использованием в качестве матрицы структурной части гена ЭПО (NP\_000790.2) и получение генетических конструкций для экспрессии заявляемого белка ЕРО-TR 4 или ЕРО-TR 6 путем полимеризации нуклеотидной последовательности мономерного пептида TR, содержащей на 5' и 3'-концах сайты рестрикции для эндонуклеаз II-го порядка *VclI* и *VamHI*, позволяющих получать полинуклеотидные фрагменты произвольной кратности.

2. Генетическая модификация клеточной линии CHO DG44 (Invitrogen, США), заключающаяся во встраивании в ДНК сайтов направленной интеграции гена интереса (FRT).

3. Конструирование экспрессионных векторов для получения заявляемых белков в клетках эукариот путем лигирования генетических конструкций в pcDNA5/FRT вектор (Invitrogen, США).

Штаммы-продуценты заявляемых белков CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>)-ЕРО-TR 1,6 №1F7, CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>)-ЕРО-TR 4 №1F7 и CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>)-ЕРО-TR 6 №1F7 депонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и имеют номера: ВКПМ Н-136, ВКПМ Н-138 и ВКПМ Н-137, соответственно.

### Способ в общем виде

Штамм-продуцент заявляемого белка ВКПМ Н-136 или ВКПМ Н-138 или ВКПМ Н-137 выращивают в виде адгезионной культуры в процессе роллерного культивирования. Для этого в роллерный флакон, площадью 850 см<sup>2</sup>, добавляют 250 мл культуральной среды ДМЕМ/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 8% фетальной сыворотки и 8 мМ L-глутамина, и засевают клетками штамма-продуцента в количестве 6,0-8,0×10<sup>4</sup> клеток на см<sup>2</sup>. Процесс культивирования проводят в течение 14 суток в СО<sub>2</sub>-инкубаторе с роллерной установкой в стандартных для адгезионных клеточных линий условиях: 5% СО<sub>2</sub>, температура 37°С, влажность не менее 90% и скорость 3-4 об/мин. Замену культуральной среды в роллерном флаконе на свежую того же состава проводят на 3, 5, 7, 9, 11, 14 сутки после посева штамма-продуцента.

Собранные сливы культуральной жидкости освобождают от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 400\*g и хранят при температуре - 20°C до использования. Выход конечного продукта - белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 - составляет 20-40 мкг/мл.

Выделение заявляемого белка из культуральной жидкости проводят методом аффинной хроматографии (Аберкромби Д., Алленмарк С. и др. Аффинная хроматография. Методы: изд. Мир, 1988. - 278 с., под ред. П. Дина, У. Джонсона, Ф. Мидла, пер. с англ. Б.А. Клящицкого). На первом этапе собранные 1500 мл культуральной жидкости размораживают, фильтруют через мембрану с номинальным отсечением 0,45 мкм (Миллипор, США), добавляют твин-20 до конечной концентрации 0,02% по объему и азид натрия до 0,04% по объему. Подготовленную таким образом культуральную жидкость медленно наносят при температуре 4°C на предварительно уравновешенную колонку с сефарозой CL - 2B (Sigma, США), объемом 70 мл, с иммобилизованными методом периодатного окисления моноклональными антителами ЭПО-1-3, специфичными к ЭПО (RU2451071).

По окончании сорбции и исчерпывающей отмывки колонки 10 мМ фосфатным буфером с рН 7,4, содержащим 0,5 М хлорид натрия и 0,02% твина-20, осуществляют элюцию белка 200 мМ глициновым буфером с рН 2,2, содержащим 1М NaCl и твин-20 в концентрации 0,02%. Раствор элюированного белка, объемом 70-75 мл, немедленно нейтрализуют добавлением 700-750 мкл 3 М трисового буфера с рН 9,0. Выход выделенного белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 составляет не менее 70%.

Далее проводят ионообменную хроматографию выделенного белка на сорбенте MonoQ HR5/5 (Pharmacia, Швеция), в соответствии с методами выделения сиалированных изоформ ЭПО-содержащих рекомбинантных белков (US 20090092607; Биотехнология: №5, 38-59, 2012). Для этого полученный на первом этапе выделения раствор белка концентрируют до объема 3-5 мл, используя ячейки Amicon Ultra-15, при 4000g в течение 15 мин и температуре 23°C. Полученный концентрат доводят до 50 мл 20 мМ трис-HCl буфером с рН 7,3 и повторно концентрируют до объема 5 мл таким же способом, а затем пропускают полученный концентрат через MonoQ HR5/5 со скоростью 0,5 мл/мин. Далее сорбент промывают 3 мл 20 мМ натрий ацетатного буфера с рН 4,5, для удаления слабосиалированных изоформ белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 с изоточками выше 4,5. Затем сорбент уравнивают 3 мл 20 мМ трис-HCl буфера с рН 7,3 и элюируют фракцию сиалированных изоформ белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 градиентом ионной силы при 0,22-0,25 М хлорида натрия. Выход конечного продукта на данной стадии составляет 80-86% от нанесенного белка. Полученные таким образом образцы белков хранят при температуре -20°C в 0,05 М Na-фосфатном буфере с рН 7,4, содержащим 0,15 М хлорида натрия.

#### 14.4. СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН (СТГ) ИЛИ ГОРМОН РОСТА ЧЕЛОВЕКА.

**СТГ - пептидный гормон**, состоящий из 191 аминокислоты, секретируется передней долей гипофиза. Впервые гормон был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза, полученного из трупного материала. Дефицит этого гормона приводит к гипофизарной карликовости, частота встречаемости которой оценивается от 7 до 10 случаев на миллион человек (среди детей западных стран она составляет 1 на 5000 человек).

Гормон видоспецифичен и является единственным средством лечения детей, страдающих от его недостатка; внутримышечное введение СТГ 10 мг/кг. В течение года по три инъекции в неделю, увеличивает рост в течение первого года лечения более чем на 6 см. Для достижения более ощутимых результатов введение гормона необходимо продолжать от возраста 4-5 лет до половой зрелости и даже далее. Из одного трупа удаётся подучить 4-6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат.

Общего количества фармацевтического препарата, выпускаемого компаниями крупных производителей СТГ, хватало для лечения лишь одной трети случаев гипофизарной карликовости в развитых странах; недостаток соматотропина оказался ещё более острым с учетом других случаев его применения (незаживающие переломы, ожоги, язвы, нарушение гемопоэза).

К тому же возникли проблемы, связанные с гетерогенностью гормона, выделяемого из трупного материала. Несмотря на совершенствование выделения и очистки гормона, у 5% больных, получавших препарат, вырабатывались антитела, которые сводили на нет его биологическую активность. Кроме того, гипофизарный материал заражён нейротоксическим вирусом с, необычайно длительным инкубационным периодом, поэтому дети, получавшие СТГ, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении. Вирус, содержащийся в препаратах СТГ, нередко приводил к летальному исходу. С 1985 г. ВОЗ запрещено применение гормона, выделяемого из человеческих гипофизов.

**Рекомбинантный соматотропин**, получивший название **соматрем**, стал вторым (после человеческого инсулина) биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 г. Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NH<sub>2</sub>-конце молекулы (гормон обладает биологической активностью нативного гормона и даже большим эффектом, чем гормон роста из гипофиза, по-видимому, по причине большей чистоты).

У детей, страдающих гипофизарной карликовостью, зарегистрирован прирост 8-18 см в год, что несколько больше эффекта гормона, полученного из гипофиза. На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстроили к паре промоторов (промотор - специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции РНК-полимеразы) и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры *E. coli* (100000 молекул гормона на клетку). СТГ, синтезированный в бактериях, обладал нужной М.м. и не связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было бы отщеплять.

Изменяя аминокислотную последовательность СТГ, т.е. его первичную структуру, посредством модификации кодирующего его гена, в бактериальных клетках можно синтезировать аналоги гормона, очень важные для изучения активных участков молекулы (например, участков, которые стимулируют рост или оказывают действие на неоглюкогенез) и этиологии карликовости на молекулярном уровне.

Используя методы рекомбинантных ДНК, можно синтезировать и другие факторы роста и факторы дифференцировки тканей, выделив вначале их мРНК, затем получив соответствующие гены. Это относится к соматомедину А, стимулирующему фиксацию серы в хряще, образование которого индуцируется соматотропином.

В 1982 г. выделен и синтезирован полипептид, содержащий из 44 аминокислотных остатков, обладающий полной биологической активностью гипоталамического рилизинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ). Введение СТГ-РФ способно компенсировать недостаток соматотропина. Применение СТГ-РФ возможно не только для лечения гипофизарной карликовости, но и при некоторых формах диабета и для ускорения регенерации тканей у людей, получивших сильные ожоги.



## 14.5. БИОТЕХНОЛОГИЯ СТЕРОИДОВ

В области превращений стероидных соединений достоинства биологических катализаторов проявляются наиболее ярко. Долгое время микробиологическая трансформация считалась специфическим методом химии стероидов.

Первые сообщения о трансформации стероидов микроорганизмами появились задолго до того, как было установлено строение основных представителей стероидов.

Еще в конце XIX в. было известно, что бактериальная флора кишечника млекопитающих превращает холестерин в копростерин, а холевую кислоту - 13 дезоксихолевую. К 1913 г. относится открытие полного расщепления холестерина микобактериями. И лишь в 30-х годах, когда была установлена структура основных стероидных гормонов, известных к тому времени, начались попытки применять трансформирующую способность микроорганизмов для препаративного получения этих соединений.

В 1948 г. впервые осуществлено введение гидроксильной группы в молекулу стероида микробиологическим путем. Но только после получения 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона из прогестерона при ферментации последнего с культурой *Rhizopus nigricans* микробиологические трансформации стероидов привлекли широкое внимание: Данная трансформация ярко продемонстрировала преимущество микробиологических методов перед химическими: введение кислородной функции в определенное положение молекулы стероида в случае химического синтеза представляло необычайно трудную задачу и требовало многочисленных химических операций, здесь же оно заменялось единственной стадией ферментационного гидроксирования.

Открытие в эти же годы терапевтической ценности кортизона наряду с указанными успехами микробиологического процесса гидроксирования привлекло огромное внимание микробиологов, химиков и врачей к данной области. Внедрение микробиологического синтеза в процессы получения стероидных гормональных препаратов вызвало переворот в фармацевтической промышленности, позволив сразу во много раз удешевить ценные препараты. Природные стерины - сырье для получения ценных препаратов.

Большой класс стероидов характеризуется наличием в молекуле специфического циклического скелета - циклопен-тапергидрофенантрена, построенного из четырех колец, три из которых шестичленные (А, В и С) и одно - пятичленное. Для обозначения различных положений этого кольца принята следующая нумерация.

К *стеринам (стеролам)* относятся стероиды, несущие в положении С-3 гидроксильную группу: Одним из наиболее важных и хорошо изученных стеринов является холестерин (класс зоостеринов), имеющий брутто-формулу  $C_{27}H_{46}O$ . Он обнаруживается почти во всех органах животных и человека. Холестерин принимает участие в физиологических процессах, происходящих в живой клетке,

Без его участия не может развиваться растущий организм. Желчные камни человека на 99% состоят из холестерина, богаты этим соединением надпочечники и другие органы. Спинной мозг и мозг рогатого скота представляет собой наилучший материал для промышленного получения холестерина. Он считался специфическим животным стерином до тех пор, пока он не был обнаружен в некоторых растениях и в морских красных водорослях. Точная структурная формула этого соединения была установлена в 1932 г., хотя впервые он был выделен из желчных камней в 1782 г.

Другие стеринны встречающиеся в природе, отличаются от холестерина или по длине боковой цепи, или по степени насыщенности.

*Стерины растений (фитостерины)*. Очень важный класс соединений, они служат Источником получения многих ценных стероидных препаратов. Эргостерин по структуре отличается от холестерина дополнительной метильной группой в боковой цепи при  $C_{24}$ , а также имеет две дополнительные двойные связи: одна из них при С-7, другая в боковой цепи при 22- и 23- углеродных атомах.

Строение эргостерина было установлено в 1934 г.

Он встречается у многочисленных представителей растительного мира, а также у грибов, микроорганизмов и других представителей живого мира. Особенно велико содержание эргостерина у дрожжевых микроорганизмов. Для промышленного получения эргостерина чаще всего используются пекарские дрожжи, содержание эргостерина в них колеблется в зависимости от питательной среды и культивирования от 0,2 до 15% на сухую массу.

Стигмастерин – один из наиболее распространенных фитостеринов, он содержится в большом количестве в соевом масле и сахарном тростнике. По структуре стигмастерин отличается от холестерина наличием двойной связи между углеродными атомами и наличием этильной группы в положении 24.

Другим широко распространенным растительным стерином является  $\beta$ -ситостерин  $C_{29}H_{50}O$ . по строению он сходен со стигмастеринном, отличаясь лишь отсутствием двойной связи в боковой цепи.

Ситостерины встречаются в хлопковом и таловом маслах, в зародышах пшеницы и натуральном каучуке, в сахарном тростнике и другом растительном материале. Коммерческим источником ситостеринов чаще всего являются тростник и хлопковое масло. Ситостерины и стигмастерин - наиболее перспективные и дешевые исходные продукты для получения стероидных гормонов.

Стерины необходимы для осуществления физиологических и биохимических функций живого организма. Предполагается, что серины требуются для образования мембранных систем, клеточных оболочек и других структурных образований. Есть данные о том, что стерины являются защитным фактором против токсического действия многих природных соединений.

Основные пути биосинтеза стероидных гормонов и холестерина. В организме животных и человека из холестерина образуются три важные группы гормонов: прогестины, половые гормоны и гормоны коры надпочечников (кортикостероиды). Основные пути биосинтеза показаны на схеме.

При образовании стероидных гормонов из холестерина сначала образуется прегненолон – основной промежуточный продукт биосинтеза стероидов и кортикостероидов. Окисление 3ОН-группы прегненолона в С=О сопровождается перемещением двойной связи; продуктом этой кетостероидизомеразной реакции является прогестерон - гормон плаценты и желтого тела.

Прегненолон является также предшественником мужских половых гормонов (тестостерона) и женских половых гормонов (эстрогенов – эстрона и эстрадиола). В коре надпочечников прогестерон превращается в кортикостерон и кортизол (гидрокортизон); секреция кортизола достигает у взрослого человека 15-30 мг в день. Эти вещества были первоначально выделены из коры надпочечников в кристаллическом виде.

Кортизол и его синтетические аналоги такие, как преднизолон или дексаметазон, принадлежит к числу современных средств экстренной терапии благодаря их уникальному противовоспалительному, десенсибилизирующему и противошоковому действию. По своему химическому строению они могут быть разделены на 11-дезоксистероиды, 11-гидроксистероиды, 11,17-дигидроксистероиды (кортизон и гидрокортизон).

## *Основные микробиологические превращения стероидов.*

Промышленный синтез названных выше ценных лекарственных препаратов стал возможен только с развитием микробиологической химии и, в частности, метода микробиологической трансформации. В качестве сырья для получения указанных лекарственных средств используется диосгенин. В последние годы изучается  $\beta$ -ситостерин как потенциально дешевый и доступный источник.

Модифицированные тем или иным способом стероиды сами могут служить субстратами проведения соответствующих целенаправленных трансформаций. Так, например, ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит вещество S. Оно, в свою очередь, является модифицированным продуктом биотрансформации моноацетата «вещества R» с помощью культуры *Corynebacterium mediolatum*.

Процесс ферментативного превращения моноацетата вещества R в вещество S с помощью культуры *Coryn. mediolatum* состоит из гидролиза 21-ацетогруппы и окисления  $3\beta$ -оксигруппы в 3-кетогруппу с одновременной миграцией двойной связи. Трансформация заканчивается практически количественным выходом вещества S, поскольку для культуры *Coryn. mediolatum* нехарактерны реакции расщепления стероидной молекулы имеет принципиальное значение в производстве кортикостероидных препаратов, поскольку стадия получения вещества S является ключевой и в значительной степени определяет конечный выход готовых продуктов следующих трансформаций.

Введение гидроксильной группы. Микробиологическое гидроксирование – это наиболее важный и часто применяемый метод. Наличие гидроксильных групп в 3, 11, 16, 11 положениях молекулы стероида, как правило, обуславливают физиологическую активность большинства гормональных стероидных препаратов.

Гидроксирование стероидов осуществляется очень многими микроорганизмами, чаще всего грибами, даже некоторые грибы обладают гидроксильной активностью. Гидроксирование стероидов при помощи гриба *Rh. nigricans* – яркий пример сочетания, специфичности и разнообразия.

11 $\beta$ -Гидроксирование как один из важнейших путей получения кортизона изучено более детально и давно применяется в промышленности, выходы продуктов трансформации очень высоки. Многие микроорганизмы образуют смесь 11 $\alpha$ - и 11 $\beta$ эпимеров, соотношение которых существенно зависит от фазы развития культуры.

Наличие в молекуле стероидов 11 $\beta$ гидроксильной группы обуславливает физиологическую активность гидрокортизона (кортизона) и преднизолона. Гидроксированию подвергаются субстраты самого различного строения – от производных эстрана до сложных молекул стероидов, сапогенинов.

Причина этого – очень широкая субстратная специфичность гидроксилаз, которую демонстрируют многие микроорганизмы.

Получение 14 $\alpha$ -гидроксипрогестерона при помощи *Bacillus cereus* является одним из немногих примеров гидроксилирования при помощи бактерий. 15 $\alpha$ -гидроксилирование осуществляется также многими микроорганизмами, основное место среди которых занимает *Penicillium*.

Главным препятствием, стоящим на пути дальнейшего развития микробиологического гидроксилирования стероидов, так же как и вообще микробиологических трансформаций этих соединений, является низкая производительность ферментаций, несмотря на высокий процентный выход по субстрату. Это обусловлено, с одной стороны, нерастворимостью стероидных субстратов в воде, с другой токсичностью растворителей, применяемых при внесении стероида и невозможностью использования высоких концентрации субстрата.

Дегидрогенизация стероидов. Наличие двойных связей коренным образом влияет на физиологическую активность препаратов. Используя эту реакцию, получают такие эффективные препараты, как преднизолон. Чаще всего микроорганизмы дегидрируют положения 1, 2 и 4, 5, но описано и введение двойной связи в положения 7, 8; 8, 9; 9, 11; 16, 17; 17, 20. Реакции дегидрогенизации осуществляют бактерии и актиномицеты, особенно часто это *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*. Широкая субстратная специфичность дегидрогеназ показана на большом экспериментальном материале; она позволяет использовать в качестве субстратов ацетаты стероидов, которые являются полупродуктами во многих технологических схемах получения стероидов. Например, *Mycobacterium globiforme* 193, дегидрирующая 1,2-связь в кортизоне, так же эффективно превращает и кортизоацетат в преднизонацетат с выходом 86%. Исследование показало, что для этой культуры характерна максимальная удельная трансформирующая активность в период снижения удельной скорости роста.

Реакция гидрогенизации позволяет получать преднизолон из кортизона, дианабол из метилтестостерона, преднизолон из гидрокортизона. Продукты 1,2-дегидрирования образуются с высокими выходами - до 86%. Распространенность этой реакции объясняется не только наличием соответствующих дегидрогеназ у большого числа микроорганизмов, но и химическими свойствами данного участка стероидной молекулы, ее нестабильностью, особенно при наличии кетогруппы в 3-м положении (или) двойной связи 4,5. Этими свойствами стероидной молекулы объясняется и доступность связи 1,2 для микробных оксидоредуктаз. Во многих случаях показана обратимость реакций дегидрогенизации и восстановления.

Микробиологическое восстановление. Этот процесс используется в меньшей степени, чем дегидрирование. Он осуществляется главным образом дрожжами и анаэробными бактериями, представителями микрофлоры кишечника млекопитающих, осуществляющими превращение холестерина в копростерин:

Описаны процессы насыщения двойных связей также и аэробными культурами, широко известными как окислители актиномицетами, микоформами и даже грибами. Например, культура *Aspergillus flavus* восстанавливает ароматическое кольцо некоторых стероидов:

Окисление гидроксильной группы в кетогруппу - одна из наиболее частых реакций, осуществляемых микроорганизмами (бактериями, актиномицетами, грибами). Наибольший практический интерес представляют окислительные превращения гидроксильных групп у 3, 17 и 20-го атомов стероидной молекулы. Окисление гидроксила в 3-м положении легко осуществляется у соединений с ненасыщенным кольцом А, а также при наличии двойной связи в положении 4. К этому же типу окислительных превращений относят введение кетогруппы в молекулу стероида.

*Гидролиз эфиров стероидов.* Проводится с помощью микроорганизмов. Имеет практическую значимость. Ацилированные стероиды являются обычными промежуточными продуктами химического синтеза, в котором используется ацильная защита функциональных групп. Хотя гидролиз осуществим химическим путем, он часто приводит к нежелательным продуктам. Микробиологическое расщепление эфирной связи осуществляется представителями различных таксономических групп, в частности флавобактериями. Культура *Vas. megaterium* обладает специфической активностью по отношению к 21- ацетатам стероидов с диоксиацетоновой цепочкой:

Дезацилирующая способность часто встречается среди микоформ, мукоровых и несовершенных грибов, актиномицетов. Особенность приведенной реакции состоит в том, что она проводится обычно одновременно с другими процессами - гидроксигированием и дегидрогенизацией. Ценность представляют как культуры, избирательно отщепляющие ацильную группу, так и микроорганизмы, способные наряду с гидролизом эфирной связи осуществлять еще какую-либо практически важную реакцию.

Отщепление боковых цепей стероидов. Представляет огромный интерес как путь получения ценных продуктов из относительно дешевых природных стероидов животного и растительного происхождения - стероидов, желчных кислот, сапогенинов.

Возрастающая потребность в производстве стероидных препаратов, а также истощение сырьевой базы делает все более актуальным поиск новых источников сырья. Стоимость диосгенина, получаемого из различных видов диоскореи, за последние годы возросла более чем в 10 раз в результате истощения запасов этих растений. В связи с этим возрос интерес к более доступным стеринам.

Основная трудность при использовании фитостеринов заключается в необходимости селективного удаления насыщенной алифатической боковой цепи с сохранением целостности стероидного скелета. Удовлетворительных методов химического расщепления до сих пор не удалось разработать, перспективными считаются лишь микробиологические способы. Однако промышленный интерес представляют только процессы расщепления боковой цепи, не затрагивающие стероидного ядра.

Проблема расщепления боковой цепи стерина с сохранением скелета может быть решена следующими способами:

1) синтезом модифицированных стерина, заместители в кольце А или В которых не позволяют микроорганизмам осуществлять 1,2-дегидрирование или 9 $\alpha$ -гидроксилирование;

2) инкубацией стерина в присутствии соединений, ингибирующих действие ферментов 9 $\alpha$ -гидроксилазы или 1,2-дегидрогеназы,

3) получением мутантных штаммов, не способных осуществлять определенные стадии расщепления самого стероидного ядра. Эти три способа, а иногда и их комбинации в сочетании с оптимальными условиями режима ферментации позволили получить из ряда стерина большой спектр промежуточных соединений, применяемых для химического синтеза высокоактивных стероидных препаратов.

### **Производство моноклональных антител с помощью *E. coli*.**

Гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности, требуют сложных и дорогих сред. Поэтому получаемые таким способом моноклональные антитела слишком дороги, чтобы их можно было массово использовать. Удешевить продукт можно, создав «биореакторы» – генетически модифицированные бактерии, животные, растения.

Последовательность операций при создании бактериальных продуцентов моноклональных антител:

1. Из *B*-лимфоцитов, вырабатывающих антитела мыши или человека, выделяют мРНК.

2. К мРНК синтезируют кДНК.

3. Проводят раздельную ПЦР-амплификацию кДНК, кодирующих *H*- и *L*-цепи.

4. С помощью рестриктаз встраивают фрагменты кДНК в вектор на основе фага  $\lambda$  (фрагменты *H*- и *L*-цепей различаются по величине) – клонирование множества фрагментов *H*- и *L*-цепей.

5. Объединяют фрагменты кДНК *H*- и *L*-цепей в одном векторе.

Получают комбинаторную библиотеку, содержащую все возможные сочетания фрагментов *H*- и *L*-цепей с экспрессией соединенного фрагмента в одном векторе. На этом этапе в одном векторе образуется широкий спектр генов различных антител. Некоторые из них кодируют уникальные сайты связывания, получить которые методом гибридомной технологии было бы невозможно. Пул антител млекопитающих включает 10<sup>6</sup>–10<sup>8</sup> разных антител. Фаговая библиотека содержит примерно столько же клонов. Поэтому можно ожидать, что одна комбинаторная библиотека будет вырабатывать такое же количество разных антител, как любое млекопитающее. Кроме того, один раз создав библиотеку, можно комбинировать *H*- и *L*-цепи и получать фрагменты АТ (участки связывания), распознающие необычные эпитопы. Еще большего разнообразия добиваются с помощью сайт-специфического мутагенеза.

6. Скрининг бляшек для выявления антиген-связывающей активности (например, с помощью ферментного иммуносорбентного анализа). Синтез *H*- и *L*-цепей происходит во время литического цикла фага  $\lambda$ .

7. Вырезание из вектора части плазмидной ДНК, фланкирующей вставку, и трансформация этой ДНК клеток *E. coli*.



Изобретение иллюстрировано фигурами 1-4.

Фиг.1. Иммунохимическая характеристика заявляемых белков методом Вестерн блота с последующим проявлением моноклональными антителами к ЭПО (RU2451071) и конъюгата козьих анти-IgG(мышь) антител с пероксидазой.

- по вертикали:

маркеры молекулярного веса от 70 до 10 кД обозначены стрелками слева от фиг.1 (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad, США);

по горизонтали:

треки разделяемых белков, а именно:

1 - маркеры молекулярного веса;

2 - EPO-TR 6;

3 - EPO-TR 4;

4 - EPO-TR 1,6.

На Фиг.2-4:

По оси X - дни забора крови и измерения показателей:

А) процента ретикулоцитов среди эритроцитарных клеток (RET, %),

Б) общего гемоглобина крови экспериментальных животных (HGB, г/дл),

В) гематокрита крови экспериментальных животных (HCT, %).

По оси Y - величина RET, % или HGB, г/дл или HCT, % (каждая точка представлена средним значением  $\pm$  SD при  $p < 0,05$ ), обозначенные:

- сплошной линией с незаштрихованным прямоугольным маркером для  $\alpha$ -дарбпоэтина;

- сплошной линией с круглым маркером для стандарта рекомбинантного эритропоэтина EPO-BRP («Erythropoietin BRP») (EPO-BRP, E1515000));

- прерывистой линией для контроля фосфатного буфера, содержащего 0,1% бычьего сывороточного альбумина.

Фиг.2. Результаты измерения показателей крови экспериментальных животных в период со 2 по 15 день после подкожного введения 30 пмоль гибридного белка EPO-TR 1,6 в сопоставлении со EPO-BRP и  $\alpha$ -дарбпоэтином;

- сплошной линией с заштрихованным прямоугольным маркером для гибридного белка EPO-TR 1,6;

Фиг.3. Результаты измерения показателей крови экспериментальных животных в период со 2 по 15 день после подкожного введения 30 пмоль гибридного белка EPO-TR 4 в сопоставлении с EPO-BRP и  $\alpha$ -дарбпоэтином;

- сплошной линией с заштрихованным прямоугольным маркером для гибридного белка EPO-TR 4;

Фиг.4. Результаты измерения показателей крови экспериментальных животных в период со 2 по 15 день после подкожного введения 30 пмоль гибридного белка EPO-TR 6 в сопоставлении с рекомбинантным ЭПО (EPO-BRP) и  $\alpha$ -дарбпоэтином;

- сплошной линией с заштрихованным прямоугольным маркером для гибридного белка EPO-TR 6;

Пример 1. Получение генетических конструкций для экспрессии заявляемых белков.

Для экспрессии белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 в клетках млекопитающих CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) используют экспрессионный вектор pCDNA5/FRT (Invitrogen, США). Этот вектор содержит: 1. CMV промотор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии; 2. FRT сайты для направленной интеграции целевого гена в геном клеток-продуцентов; 3. Ген устойчивости к гиромизину для селекции стабильных клеточных штаммов-продуцентов.

Генетическая конструкция для экспрессии белка EPO-TR 1,6 (SEQ ID NO:1) получена методом перекрывающейся полимеразной цепной реакции (SOE-PCR) с использованием в качестве матрицы структурной части гена ЭПО (NP\_000790.2) (Molecular cloning: 3 ed, ext. 13.36, N-Y, 2001), а для экспрессии белков EPO-TR 4 (SEQ ID NO:2) или EPO-TR 6 (SEQ ID NO:3) - путем полимеризации мономерных пептидов TR, содержащего на 5' и 3'-концах сайты рестрикции для эндонуклеаз рестрикции II-го порядка BclI и BamHI (Биоорганическая химия, 26, 6, 423-432, 2000) с последующим лигированием в экспрессионный вектор pCDNA5/FRT, содержащий ген ЭПО.

Для подтверждения корректности структуры полученные нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 лигировали в клонирующий вектор pUC-57 (Invitrogen, США), используемый для трансформации клеток штамма E.coli TOP10. Селекцию клонов E.coli TOP10 проводили по стандартной методике на чашках с X-gal/IPTG-агаром (blue/white - тест). Далее использовали процедуру секвенирования стандартными праймерами для вектора pUC-57. Затем, последовательность, кодирующую белок EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR6, вырезают по сайтам рестрикции, очищают в агарозном геле и лигируют в экспрессионный вектор pCDNA5/FRT.

Для получения генетической конструкции, соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, методом перекрывающейся полимеразной цепной реакции (SOE-PCR) используют праймеры 1-4 (табл.1), (ЗАО «Евроген», Россия).

Табл.1

Праймеры для конструирования SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3

Подчеркнутые последовательности нуклеотидов 2, 3 и 4 перекрываются при амплификации. Внесенные сайты рестрикции выделены курсивом, старт-кодон выделен жирным шрифтом, стоп-кодон помечен звездочкой.

№ праймера	Нуклеотидная последовательность	Сайты рестрикции
1	5'-TTT GCT AGC ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC-3'	NheI
2	5'-CAC TGG TCA CGC CAT GTG CTG GCG GTG CGG TTG ATC <u>CGT CCC CTG TCC</u> <u>TGC</u> -3'	
3	5'-TGC GGT TGA TCC CGG TGC CGG ACG GGT ATC TGG AGC <u>ACT GGT CAC GCC</u> <u>AT</u> -3'	
4		XhoI
5	5'-TTTT TGA TCA ACC GCA CGC CAG CAC ATG GCG TGA CCA GTG CT-3'	BclI
6	5'-AAA AGG ATC CCG GTG CCG GAC GGG TAT CTG GAG CAC TGG TCA CGC CA-3'	BamHI
7		XhoI

Для этого на первом этапе проводят 25 циклов амплификации с температурой отжига 47°C прямым праймером 1 и обратным праймером 2. Полученный и очищенный в агарозном геле продукт длиной 622 пар нуклеотидов (п.н.) используют для второго этапа амплификации с праймером 1 и обратным праймером 3 (25 циклов с температурой отжига 46°C). ПЦР продукт 657 п.н. используют для третьего этапа ПЦР с праймером 1 и

обратным праймером 4 (25 циклов с температурой отжига 65°C). Полученный продукт SEQ ID NO:1 длиной 693 п.н. фосфорилируют с использованием ДНК киназы T4 и лигируют по тупым концам в клонирующий вектор pUC-57 по сайту рестрикции SmaI для последующей идентификации. Идентифицированную конструкцию SEQ ID NO:1 вырезали из вектора pUC-57 по сайтам NheI и XhoI и лигируют в экспрессионный вектор pcDNA5/FRT, порезанный по тем же сайтам.

Полимеризацию мономерного пептида TR для генетических конструкций SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 осуществляют с использованием полученного ранее вектора pUC57-TR<sub>1</sub>, в котором структура пептида фланкирована участками узнавания рестриктаз BclI и BamHI, позволяющими проводить полимеризацию мономера и получать полинуклеотидные фрагменты произвольной кратности (Биорган. химия: 26, 6, 423-432, 2000). Полученный в результате рестрикции из pUC57-TR<sub>1</sub> мономерный пептид TR, содержащий с 5' конца сайт рестрикции BclI, и с 3' конца сайт рестрикции BamHI достраивают комплементарными олигонуклеотидами с использованием праймеров 5 и 6 или 5 и 7 (Табл. 1.), получая соответственно нуклеотидные последовательности TR 1 или TR 2. Последовательность TR1 клонируют в векторе pUC-57, идентифицируют и используют для полимеризации путем последовательных рестрикций - лигирования по BclI и BamHI.

Далее в эту лигазную смесь добавляют предварительно порезанную по BclI сайту и обработанную щелочной фосфатазой плазмиду pUC-TR 2, содержащую последовательность мономерного пептида TR со стоп-кодоном.

Лигазионную смесь трансформируют клетки E.coli. В последующем скрининге выбирают ДНК-вставки, содержащие 4 или 6 повторов пептида TR. Идентифицированные ДНК, содержащие последовательности полимеров TR 4 и TR 6, вырезают по сайтам рестрикции BclI и XhoI, очищают в агарозном геле и лигируют в экспрессионный вектор pcDNA5/FRT, содержащий ген человеческого эритропоэтина, по сайтам BamHI и XhoI.

В результате получают нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1, длиной 693 п.н. или SEQ ID NO:2, длиной 828 п.н. или SEQ ID NO:3, длиной 948 п.н. и экспрессионный вектор pcDNA5/FRT, со встроенной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, предназначенный для получения штамма-продуцента гибридного белка EPO-TR 1,6, соответствующего аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4 или EPO-TR 4 - аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5 или EPO-TR 6, с аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, соответственно. Расчетный молекулярный вес экспрессируемых белков EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 и EPO-TR 6, охарактеризованный в программе Vector NTI.10 (Invitrogen, США), составляет 21,2 кД, 25,8 кД и 29,5 кД, соответственно.

Пример 2. Получение генно-модифицированной клеточной линии CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) и штаммов-продуцентов заявляемых белков.

Генно-модифицированную линию клеток CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) получают путем трансфекции линии клеток CHO DG44 (Invitrogen, США) вектором pFRT/LacZeo/DHFR, содержащим кассету генов: ген дегидрофолатредуктазы (DHFR), слитый ген β-галактозидазы и маркера устойчивости к зеоцину (LacZeo), под контролем промотера pSV40Δ гены, а также сайт специфической гомологичной рекомбинации для Flp рекомбиназы (FRT).

Вектор pFRT/LacZeo/DHFR получают путем лигирования в вектор pcDNA5(FRT)LacZeo2, несущий FRT-последовательность для связывания дрожжевой рекомбиназы и слитый ген LacZeo (Invitrogen, США), структурной части гена DHFR мыши, взятой из вектора pOptiVEC (Invitrogen, США), и промоторной области SV40 вектора pCI-neo (Promega).

По окончании этапа двухмаркерной селекции линии клеток CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) (устойчивость к зеоцину и восстановление фенотипа dhfr<sup>+</sup>) и восстановления ростовых характеристик выполняют процедуру клонирования. Для конструирования штаммов-продуцентов выбирают клон линии CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>), обладающий лучшими показателями транскрипционной активности и стабильности экспрессии гена lacZeo. Штаммы, экспрессирующие белок EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6, получают в результате со-трансфекции линии CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) экспрессионным вектором pcDNA5/FRT, со встроенной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 (Пример 1), и плазмидой pOG44 (Invitrogen, США), несущей ген дрожжевой рекомбиназы, в соотношении 1:9. Селекцию и клонирование полученных штаммов проводят при концентрации гидромицина 600 мкг/мл. Метотрексат-зависимую амплификацию клонированных штаммов проводят при концентрациях метотрексата 250-1000 мкМ и поддерживающей дозе гидромицина 50 мкг/мл. Содержание заявляемых белков в к.ж. оценивают использованием ИФА на ЕРО (Эритропоэтин-ИФА-Бест, ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

В результате получены модифицированная линия клеток млекопитающих CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) и штаммы CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>)-EPO-TR 1,6 №1F7, CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) - EPO-TR 4 №1F7 и CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) - EPO-TR 1,6 №1F7.

Пример 3. Экспрессия и очистка заявляемого белка EPO-TR 1,6.

Для получения белка EPO-TR 1,6 проводят роллерное культивирование штамма-продуцента CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) EPO-TR 1,6 №1F7. Роллерные флаконы, площадью 850 см<sup>2</sup>, засевают клетками штамма-продуцента в количестве 4,0 тыс. клеток на см<sup>2</sup>. Культивирование проводят в среде DMEM /F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 8% фетальной сыворотки. Объем среды составляет 250 мл. Процесс роллерного культивирования проводят в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с роллерной установкой при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажности >90% и скорости 3-4 об/мин. Замену культуральной среды в роллерном флаконе на свежую того же состава проводят на 3, 5, 7, 9, 11, 14 сутки после посева штамма-продуцента. Собранные сливы культуральной жидкости (к.ж.) освобождают от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 400\*g и хранят при температуре - 20°C. Определение количественного содержания белка EPO-TR 1,6 в культуральной жидкости проводят методом иммуноферментного анализа (Эритропоэтин-ИФА-Бест, ЗАО «Вектор-Бест») (табл.2). Содержание белка EPO-TR 1,6 в полученной культуральной жидкости составляет 29 мг/мл.

Для выделения белка EPO-TR 1,6 полученные в результате роллерного культивирования 1500 мл культуральной жидкости размораживают и фильтруют через мембрану с номинальным отсеиванием 0,45 мкм (Миллипор С.А.). Затем добавляют твин-20 до конечной концентрации 0,02% по объему и азид натрия до 0,04% по объему.

Выделение белка осуществляют методом аффинной хроматографии. Для сорбции белка EPO-TR 1,6 подготовленную таким образом культуральную жидкость медленно наносят при температуре 4°C на предварительно уравновешенную колонку с сефарозой CL - 2B (Sigma, США), объемом 70 мл, с иммобилизованными моноклональными антителами ЭПО-1-3, специфичными к ЭПО (RU2451071). По окончании сорбции и исчерпывающей отмывки колонки 10 мМ фосфатным буфером с pH 7,4, содержащим 0,5 М хлорид натрия и 0,02% твина-20, проводят элюцию белка EPO-TR 1,6 200 мМ глициновым буфером с pH 2,2, содержащим 1М NaCl и твин-20 в концентрации 0,02%. Раствор элюированного белка, объемом 71 мл, немедленно нейтрализуют добавлением 710 мкл 3 М трисового буфера с pH 9,0. Выход белка EPO-TR 1,6 после аффинной хроматографии составляет 79%.

Далее проводят ионообменную хроматографию выделенного EPO-TR 1,6 на сорбенте MonoQ HR5/5 (Pharmacia, Швеция), подготовленном в соответствии с инструкцией производителя. Для этого полученный на предыдущей стадии белок EPO-TR 1,6 концентрируют до объема 5 мл, используя ячейки Amicon Ultra-15, при 4000\*g в течение 15 мин и температуре 23°C. Полученный концентрат доводят до объема 50 мл 20 мМ буфером трис-HCl с pH 7,3 и повторно концентрируют до объема 5 мл. Полученный объем пропускают через MonoQ HR5/5 со скоростью 0,5 мл/мин. Далее ионообменный сорбент промывают 3 мл 20 мМ натрий ацетатного буфера с pH 4,5, для удаления слабосилированных изоформ белка EPO-TR 1,6 с изоточками выше 4,5.

Табл.2

Содержание белка EPO-TR 1,6 в к.ж. и в выделенном препарате

Клеточная линия штамма-продуцента	Содержание EPO-TR 1,6 в к.ж., мкг/мл	Содержание EPO-TR 1,6 в препарате после очистки, мг/мл	Молярная концентрация EPO-TR 1,6 в выделенном препарате, нМ/мл
1	2	3	4
CHO DG44(FRT <sup>+</sup> /DHFR <sup>+</sup> )-EPO-TR 1,6	29	2	35

Затем сорбент уравновешивают 3 мл 20 мМ трис-HCl буфера с pH 7,3 и элюируют фракцию кислых изоформ белка EPO-TR 1,6 при 0,22 М хлорида натрия. Объем элюата составляет 4 мл. Концентрацию очищенного белка EPO-TR 1,6 определяют методом Брэдфорд (BioRad Protein Assay, BioRad, США). Выделенная фракция кислых изоформ EPO-TR 1,6 составляет 86% от общего количества нанесенного на MonoQ HR5/5 белка EPO-TR 1,6.

Очищенный образец белка EPO-TR 1,6 переводят в 0,05 М Na-фосфатный буферный раствор с pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl, доводя концентрацию белка в растворе до 2 мг/мл, и хранят при -20°C.

Иммунохимические свойства белка EPO-TR 1,6 характеризуют методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия, по стандартному протоколу Лэмбли с последующим Вестерн блотом. Белок переносят на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм в течение 30 минут при 5 мА/см<sup>2</sup> (BioRad, США). Далее нитроцеллюлозу с перенесенным белком инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч в растворе, содержащем 3% молока для иммуноблотинга (BioRad, США), затем инкубируют с моноклональными антителами мыши к ЭПО 2A1 (RU2451071) в течение 2 ч, с последующей 3-кратной отмывкой фосфатным буфером с pH 7,2, содержащим 0,05% твина-20. Иммуноспецифическое проявление белка EPO-TR 1,6 выявляют после 2 ч инкубации с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител козы к иммуноглобулину мыши (ООО «Сорбент», Россия) в разведении 1:3000 с использованием хромогенной субстратной смеси с тетраметилбензидином (Sigma, США).

Результаты идентификации белка EPO-TR 1,6 в Вестерн блоте представлены на Фиг.1, трек 4. Заявляемый белок EPO-TR 1,6 характеризуется молекулярной массой 55 кД, рассчитанной по маркерам молекулярного веса (BioRad, США), превышающей расчетный вес 21,2 кД (см. Пример 1), что свидетельствует о гликозилированности экспрессируемого белка.

Пример 4. Экспрессия и очистка заявляемого белка EPO-TR 4.

Получение белка EPO-TR 4 проводят так же, как белка EPO-TR 1,6 (пример 3), но с использованием штамма CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DHFR<sup>+</sup>) EPO-TR 4 №1F7. При этом содержание белка EPO-TR 4 в полученной к.ж. составляет 20 мкг/мл.

Выделение белка EPO-TR 4 из к.ж. осуществляют аналогично процедуре, приведенной в примере 3, но получают 74 мл элюированного белка, который нейтрализуют добавлением 740 мкл 3 М трисового буфера с pH 9,0. Выход очищенного EPO-TR 4 после аффинной хроматографии составляет 76%.

Полученный раствор белка EPO-TR 4 концентрируют до объема 3 мл, используя ячейки Amicon Ultra-15, как в примере 3. Концентрат доводят до 50 мл 20 мМ буфером трис-HCl с pH 7,3 и повторно концентрируют до объема 3 мл. Ионообменную хроматографию выделенного EPO-TR 4 проводят аналогично процедуре, приведенной в примере 3. Выделенная фракция кислых изоформ EPO-TR 4 составляет 83% от общего количества нанесенного на MonoQ HR5/5 белка EPO-TR 4.

Табл.3

Содержание белка EPO-TR 4 в к.ж. и в выделенном препарате

Клеточная линия штамма-производителя	Содержание EPO-TR 4 в к.ж., мкг/мл	Содержание EPO-TR 4 в препарате после очистки, мг/мл	Молярная концентрация EPO-TR 4 в выделенном препарате, нМ/мл
1	2	3	4
CHO DG44 (FRT <sup>+</sup> /DHFR <sup>+</sup> )-EPO-TR 4	20	2	33

Иммунохимические свойства белка EPO-TR 4 определяют как описано в примере 3. Результаты идентификации EPO-TR 4 представлены на Фиг.1, трек 3. Заявляемый белок EPO-TR 4 характеризуется молекулярной массой 60 кД, рассчитанной по маркерам молекулярного веса (BioRad, США), превышающей расчетный вес 25,8 кД (см. Пример 1), что свидетельствует о гликозилированности экспрессируемого белка.

Пример 5. Экспрессия и очистка заявляемого белка EPO-TR 6.

Получение белка EPO-TR 6 проводят так же, как в примере 3, но с использованием штамма-производителя CHO DG44 (FRT<sup>+</sup>/DWR<sup>+</sup>) EPO-TR 6 №1F7. При этом содержание гибридного белка EPO-TR 6 в полученной к.ж. составляет 21 мкг/мл. Выделение белка EPO-TR 6 из к.ж. осуществляют аналогично примеру 3, но получают 75 мл элюированного белка, который нейтрализуют добавлением 750 мкл 3 М трисового буфера с pH 9,0. Выход EPO-TR 6 после аффинной хроматографии составляет 73%.

Полученный раствор белка EPO-TR 6 концентрируют до объема 3 мл, используя ячейки Amicon Ultra-15, и проводят ионообменную хроматографию выделенного EPO-TR 6, как описано в примерах 3. Выделенная фракция кислых изоформ EPO-TR 6 составляет 87% от общего количества нанесенного на MonoQ HR5/5 белка EPO-TR 6.

Табл.4

Содержание EPO-TR 6 в к.ж. и в выделенном препарате

Клеточная линия штамма-производителя	Содержание EPO-TR 6 в к.ж., мкг/мл	Содержание EPO-TR 6 в препарате после очистки, мг/мл	Молярная концентрация EPO-TR 6 в выделенном препарате, нМ/мл
1	2	3	4
CHO DG44 (FRT <sup>+</sup> /DHFR <sup>+</sup> )-EPO-TR 6	21	2	28

Иммунохимические свойства белка EPO-TR 6 характеризуют как описано в примере 3.

Результаты идентификации EPO-TR 6 представлены на Фиг.1, трек 2. Заявляемый белок EPO-TR 6 характеризуется молекулярной массой 70 кД, рассчитанной по маркерам молекулярного веса (BioRad, США), превышающей расчетный вес 29,5 кД (см. Пример 1), что свидетельствует о гликозилированности экспрессируемого белка.

Пример 6. Оценка биологической активности заявляемых белков in vitro.

Биоактивность in vitro заявляемого белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 определяют по их способности связываться с рецептором ЭПО и таким образом инициировать пролиферацию чувствительной к ЭПО клеток линии UT-7/EPO. Скорость пролиферации клеток линии UT-7/EPO пропорциональна количеству гормона ЭПО (или его модификации), добавленного в среду (Blood, 1993, Vol 82, pp 456-464). Скорость пролиферации определяют с помощью колориметрического теста. Метод основан на реакции восстановления бесцветных тетразолиевых солей с образованием окрашенного соединения - формазана. Восстановление солей тетразолиума происходит только под воздействием ферментативной активности живых клеток - сукцината дегидрогеназы. Степень окрашивания пропорциональна количеству живых клеток и позволяет измерить степень клеточной пролиферации (Mosmann T., J.Immunol.Methods, 1983, 65(1-2), P. 55-63). В качестве субстрата для ферментативной реакции используют реакционную смесь для колориметрического измерения пролиферации клеток фирмы Promega (CellTiter 96R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay), содержащую 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум (MTS) и феназин метосульфат (PMS) (Promega, Madison, WI, USA).

В качестве стандарта используют препарат рекомбинантного эритропоэтина человека - EPO-BRP.

Клетки линии UT-7/EPO выращивают в среде IMDM (ПанЭко, Россия) с добавлением 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% фетальной сыворотки (Invitrogen, США) и 1 МЕ/мл рекомбинантного ЭПО. Непосредственно перед проведением теста клеткам заменяют питательную среду на свежую без добавления ЭПО и инкубируют 24 часа для истощения концентрации гормона ЭПО в клетках. Истощенные таким образом клетки рассаживают в 96-луночную планшете (2\*10<sup>3</sup> клеток/на лунку) в 75 мкл среды IMDM с 0,5% фетальной сыворотки. Далее в те же лунки добавляют по 25 мкл среды, содержащей от 0 до 500 пикомолей (пкМ) одного из заявляемых гибридных белков или стандарта рекомбинантного ЭПО. Планшеты со стимулированными клетками инкубируют в течение 72 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Далее к клеткам добавляют по 20 мкл субстрата. Цветная реакция развивается в течение 2-х часов при 37°C, и поглощение (А) измеряют при длине волны 490 нм.

Расчет показателя ED50 (табл.5), который представляет собой концентрацию белка, вызывающую 50%-ый уровень пролиферации чувствительных клеток, производят в программе GraphPad PRISM.

Таблица 5

ED50 для стандарта рекомбинантного эритропоэтина EPO-BRP и заявляемых белков EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 и EPO-TR 6	ED50 (пкМ)
Вид ЭПО-содержащего белка	ED50 (пкМ)
EPO-BRP	18,18±1,09
EPO-TR 1.6	8,18±1,12

EPO-TR 4  
EPO-TR 6

8,656±1,07  
10,01±1,14

Представленные в табл.5 данные позволяют заключить, что все заявляемые белки способны взаимодействовать с клеточными рецепторами к ЭПО и вызывать ЭПО-зависимую пролиферацию чувствительных клеток UT-7/EPO. Сопоставление величин ED50 для стандарта рекомбинантного ЭПО и заявляемых белков показывает, что для достижения одного и того же пролиферативного эффекта требуется значительно большее количество стандартного рекомбинантного ЭПО, чем заявляемых белков.

Таким образом, заявляемые белки EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 и EPO-TR 6 обладают функциональными свойствами рекомбинантного ЭПО человека, то есть способны взаимодействовать с рецепторами к ЭПО и вызывать пролиферацию клеток *in vitro*.

Пример 7. Оценка биологической активности заявляемых белков *in vivo*.

Для оценки биологической активности гибридных белков EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 и EPO-TR 6 *in vivo* используют в качестве модели мышей линии Balb/c (Brazilian Journal of Medical and Biological Research: 36, 1561-1569, 2003).

Каждый из заявляемых белков EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 или EPO-TR 6 вводят подкожно группе из восьми животных. Объем введенного белка составляет 0,5 мл. Содержание биологически активного белка во введенном препарате составляет от 0,075 до 0,3 мкг в 1 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7,2), содержащего 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Данный диапазон концентраций позволяет получать линейную зависимость между количеством ретикулоцитов и дозой белка. Тот же буферный раствор с альбумином вводят подкожно контрольной группе животных.

Для построения калибровочной кривой отдельной группе животных вводят по 160, 80, 40 или 20 МЕ/мл стандарта рекомбинантного EPO-BRP. По истечении 4-х дней со дня инъекций в крови подопытных животных измеряют число ретикулоцитов в крови животных, взятой из орбитального синуса в пробирку с этилендиаминдиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (Microvette-200 ЭДТА, Sarstedt, Германия), и их процентное отношение к количеству зрелых эритроцитов (RET, %). Количественное определение гемопозитической активности заявляемых белков EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 или EPO-TR 6 в сравнении со стандартом рекомбинантного ЭПО проводят с использованием проточного гемоцитометра-анализатора ADVIA 120 (Bayer-Siemens) и программы обработки данных Multispecies Software 2120.

Табл.6

Удельная биологическая активность заявляемых гибридных белков в сопоставлении со стандартом рекомбинантного ЭПО

Вид ЭПО-содержащего белка

Удельная активность белка,  
МЕ/мг  
141120  
648972±37264  
1507278±22722  
2399464±27643

EPO-BRP  
EPO-TR 1,6  
EPO-TR 4  
EPO-TR 6

Результаты, представленные в табл.6, показывают, что биологическая активность белка EPO-TR 1,6 в четыре раза, белка EPO-TR 4 - в десять раз, а белка EPO-TR 6 - в 15 раз выше удельной биологической активности рекомбинантного ЭПО. Таким образом, заявляемые гибридные белки EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 или EPO-TR 6 *in vivo* характеризуются более высоким потенциалом стимуляции эритропоэза, чем рекомбинантный ЭПО.

Пример 8. Оценка стимуляции процесса кроветворения заявляемыми белками *in vivo*.

Для оценки биологических свойств белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 проводят измерение основных показателей стимуляции гемопоэза в течение 15 дней после однократного подкожного введения группе из 8 экспериментальных животных 0,5 мл раствора, содержащего 0,05 М Na-фосфатный буфер с рН 7,4; 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 300 пкМ белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6. Контролями служат 8 экспериментальных животных после подкожного введения 0,5 мл раствора, содержащего 300 пкМ EPO-BRP или 300 пкМ  $\alpha$ -дарбпозтина, а также 8 животных после подкожного введения такого же буферного раствора, но не содержащего ни один биологически активный белок. Ежедневно в течение 15 дней после начала экспериментов в крови модельных животных измеряют уровень ретикулоцитов (RET), гемоглобина (HGB) и гематокрита (HCT). Измерение параметров гемопоэза проводят в проточном гемоцитометре-анализаторе ADVIA 120 (Bayer-Siemens, Германия).

Результаты эксперимента, представленные на Фиг.2-4, показывают наличие эффекта стимуляции процесса кроветворения белками EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 и EPO-TR 6, которое выражается в увеличении числа ретикулоцитов после инъекции, достигающее максимума на 4-е сутки (А), повышении показателей гемоглобина (Б) и гематокрита (В) и сохраняется в течение 8-12 дней. Следует отметить, что при введении EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 или EPO-TR 6 измеренные уровни гемоглобина и гематокрита достоверно выше, чем у эквивалентной дозы стандарта рекомбинантного эритропоэтина EPO-BRP. Кроме того, способность вызывать гемопозитический ответ у белков EPO-TR 1,6, EPO-TR 4 или EPO-TR 6, в отличие от EPO-BRP, сохраняется в течение не менее 8 дней, что свидетельствует о наличии у заявляемых белков пролонгированных свойств. Сопоставление результатов эксперимента, полученных при введении равных доз EPO-TR 1,6, EPO-TR 4, EPO-TR 6 и  $\alpha$ -дарбпозтина, известного высокой способностью к пролонгации, показывает, что на протяжении 7 суток заявляемые белки и  $\alpha$ -дарбпозтин вызывают сопоставимые изменения показателей гемопоэза, а на 8 сутки  $\alpha$ -дарбпозтин оказывает более слабое воздействие на процесс кроветворения, чем EPO-TR 1,6, EPO-TR 4, EPO-TR 6.

Таким образом, заявляемые белки EPO-TR 1,6, EPO-TR 4, EPO-TR 6 обладают по сравнению со стандартом рекомбинантного эритропоэтина большим потенциалом для коррекции гемопоэза, сопоставимым с аналогичными свойствами  $\alpha$ -дарбпозтина.

Пример 9. Оценка фармакокинетических свойств заявляемых белков.

Исследование длительности циркуляции белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 *in vivo* проводят на линии мышей Balb/c. Шести модельным животным вводят в хвостовую вену по 0,25 мл раствора, содержащего по 0,05 М Na-фосфатный буфер с рН 7,4; 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 60 пкМ/кг веса животного белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6. Контролями служат 6 экспериментальных животных после подкожного введения 0,5 мл раствора, содержащего 60 пкМ/кг стандарта EPO-BRP или 60 пкМ/кг  $\alpha$ -дарбпозтина, а также 6 животных после подкожного введения такого же буферного раствора, но не содержащего ни один биологически активный белок. Измерение уровней всех содержащих ЭПО белков в сыворотке крови экспериментальных животных проводят через 5, 60, 120, 360, 480 минут после инъекции методом ИФА в системе Эритропоэтин-ИФА-Бест (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), используя индивидуальные для каждого белка калибровочные кривые.

Для расчета параметров, характеризующих динамику циркуляции и выведения (элиминации) ЭПО-содержащих белков из организма экспериментальных животных, используют общепринятый подход построения кинетической кривой первого порядка для однокамерной модели -  $C_t = C_0 \cdot \exp(-K \cdot t)$  (Current Clinical Pharmacology: 1, 5-20, 2006; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics: 282, 520-527, 1997),

где  $C_t$  - концентрация белка через время  $t$  после его введения экспериментальному животному;

$C_0$  - концентрация белка при  $t=0$ ;

$K \cdot t$  - постоянная скорость элиминации.

Расчет скорости элиминации  $K \cdot t$ , площади под кинетической кривой AUC и времени полувыведения  $t_{1/2}$  для каждого из белков проводят по следующим формулам:

$$K \cdot t = (\ln C_0 - \ln C_t),$$

$$AUC = C_0 / K \cdot t,$$

$$t_{1/2} = 0,693 / K \cdot t, \text{ где}$$

AUC - величина площади под фармакокинетической кривой,

$t_{1/2}$  - время полувыведения белка из организма.

Представленные в табл.7 данные иллюстрируют различия в динамике циркуляции белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 по сравнению со стандартом рекомбинантного эритропоэтина EPO-BRP и  $\alpha$ -дарбпозтином в крови экспериментальных животных.

Как видно из приведенных в табл.7, время полувыведения гибридных белков из организма экспериментальных животных более 2,3 ч, соответствующих времени полувыведения стандарта рекомбинантного эритропоэтина, а скорость элиминации в 10 раз ниже, чем у стандарта рекомбинантного эритропоэтина. Гибридные белки EPO-TR 1,6, EPO-TR 4, EPO-TR 6, в отличие от EPO-BRP, обладают пролонгированными свойствами, схожими со свойствами  $\alpha$ -дарбпоэтина.

Табл.7

Сравнительные фармакокинетические показатели белка EPO-TR 1,6 или EPO-TR 4 или EPO-TR 6 и контролей EPO(BRP) и  $\alpha$ -дарбпоэтина

	Доза, рмоль/кг	KI, рмоль/ч	AUC, рмоль*ч/ml	T <sub>1/2</sub> , ч
EPO (BRP)	60	0,31	0,21	2,3
EPO-TR 1,6	60	0,091	1,1	7,6
EPO-TR 4	60	0,047	2,55	14,7
EPO-TR 6	60	0,047	2,54	14,4
$\alpha$ -дарбпоэтин	60	0,56	2,13	13

Таким образом, показано, что заявляемые белки

- обеспечивают стимуляцию образования предшественников эритроцитов-ретикулоцитов у экспериментальных животных и обладают способностью эффективно корректировать процесс кроветворения;
- обладают более высокой, чем стандарт рекомбинантного эритропоэтина EPO(BRP), биологической активностью, рассчитанной по числу ретикулоцитов в крови экспериментальных животных на 4 сутки после введения гибридного белка;
- уровень стимуляции гемопоэза заявляемыми белками намного превышает эффективность стандарта рекомбинантного эритропоэтина EPO(BRP) и сопоставим с эффективностью  $\alpha$ -дарбпоэтина;
- оценка фармакокинетических параметров показывает, что заявляемые белки обладают пролонгированным действием. При этом время циркуляции в организме экспериментальных животных у гибридного белка EPO-TR 1,6 в 3 раза больше, чем у стандарта рекомбинантного эритропоэтина EPO(BRP), а фармакокинетические параметры гибридных белков EPO-TR 4 и EPO-TR 6 намного превышают аналогичные показатели EPO(BRP) и сопоставимы с параметрами  $\alpha$ -дарбпоэтина;
- разработан способ получения заявляемых белков путем культивирования сконструированных штаммов-продуцентов в подходящих условиях с последующим выделением их из культуральной жидкости методами аффинной и ионообменной хроматографии.