



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 26853 (13) C1
(51) 6 C 07 K 14/61; A 61 K 38/27ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СТАБІЛЬНОГО СОМАТОТРОПІНУ, СТАБІЛЬНИЙ СОМАТОТРОПІН І
КОМПОЗИЦІЯ СТАБІЛЬНОГО СОМАТОТРОПІНУ

1

- (20) 93004092 (28.10.93)
(21) 4895049/04
(22) 07.09.89
(24) 29.12.99
(31) 242542
(32) 12.09.88
(33) US
(85) 11.03.91 (SU)
(86) PCT/US89/03871 (07.09.89)
(46) 29.12.99. Бюл. № 8
(56) 1. J. Biol. Chem., 1954, 211, p.55.
2. Патент США № 4443539, кл. C 12 H 15/00, 1984.
3. Патент США № 4645755, кл. A 61 K 37/36, 1987.
4. Шредер Э., Любке К. Пептиды. - М.: Мир. - 1967. - Ч.1. - С.116, 306.
(72) Рандава Зафар І. (US), Сіні Джеймс Є. (US)
(73) Пітман-мур Інк. (US)
(57) 1. Способ получения стабильного соматотропина, отличающийся тем, что включает стадии селективного восстановления дисульфидной связи малой петли соматотропина органическим меркаптосоединением общей формулы R-SH для получения двух меркаптогрупп, где R представляет углеводородную группу, имеющую 1-6 атомов углерода, необязательно замещенную гидроксигруппой, взаимодействия в полученном соединении двух меркаптогрупп из дисульфидной связи малой петли соматотропина с карбамоилалкилгалогенидом, имеющим 1-7 атомов углерода.
2. Способ по п. 1, в котором исходный соматотропин представляет собой свиной соматотропин.
3. Способ по п. 1, в котором дисульфидную связь малой петли соматотропина восстанавливают дитиотреитолом или 2-меркаптоэтанолом.

2

4. Способ по п. 1, в котором меркаптогруппы дисульфидной связи малой петли соматотропина подвергают взаимодействию с йодацетамидом.

5. Стабильный соматотропин, полученный селективным восстановлением дисульфидной связи малой петли соматотропина органическим меркаптосоединением общей формулы R-SH для получения двух меркаптогрупп, где R представляет углеводородную группу, имеющую 1-6 атомов углерода, необязательно замещенную гидроксигруппой, и последующим взаимодействием в полученном соединении двух меркаптогрупп из дисульфидной связи малой петли соматотропина с карбамоилалкилгалогенидом, имеющим 1-7 атомов углерода.

6. Соматотропин по п. 5, в котором соматотропин представляет собой свиной соматотропин.

7. Соматотропин по п. 5, отличающийся тем, что дисульфидная связь малой петли соматотропина восстановлена дитиотреитолом или 2-меркаптоэтанолом.

8. Соматотропин по п. 5, отличающийся тем, что меркаптогруппы дисульфидной связи малой петли соматотропина были подвергнуты взаимодействию с йодацетамидом.

9. Композиция стабильного соматотропина, содержащая соматотропин и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что в качестве соматотропина она содержит соматотропин, полученный селективным восстановлением дисульфидной связи малой петли соматотропина органическим меркаптосоединением общей формулы R-SH для получения двух меркаптогрупп, где R представляет углеводородную группу,

(19) UA (11) 26853 (13) C1

имеющую 1-6 атомов углерода, необязательно замещенную гидроксид- или меркаптогруппой, и последующим взаимодействием в полученном соединении двух меркаптогрупп дисульфидной связи малой петли соматотропина с карбамоилалкилгалогенидом, имеющим 1-7 атомов углерода в эффективном количестве.

10. Композиция по п. 9, в которой соматотропин представляет собой свиной соматотропин.

11. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что дисульфидная связь малой петли соматотропина восстановлена дитиотрептолом или 2-меркаптоэтанолом.

12. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что меркаптогруппы малой петли соматотропина модифицированы с помощью йодацетамида.

Это изобретение относится, в основном, к соматотропинам, и, в частности, к стабильному и биоактивному соматотропину, а также к способам получения стабильных и биоактивных соматотропинов.

Известный уровень техники

Выделение, очистка и свойства соматотропинов известны в данной области техники. Соматотропин, иногда называемый гормоном роста, и получают из гипофиза на протяжении жизни животного. Известно, что соматотропин ускоряет рост скелета, фиксацию азота, синтез белка и воздействует на метаболизм глюкозы и липидов. Таким образом, соматотропин известен как анаболический агент.

Соматотропин может быть выделен путем иссечения ткани гипофиза. См. например, Li, F.Biol.Chem, 211, 55 (1954). Соматотропин может быть также получен путем генной инженерии из микроорганизмов, содержащих рекомбинантную ДНК, которая определяет получение (производство) соматотропина. См. например, Seeburg, et al., Nature, 276, 795-798 (1978); Seeburg et al., Nature, 270, 486-494 (1978); Martial Science, 205, 602-607 (1979); Seeburg, et al., DNA, 2, 37-45 (1983).

Соматотропины отдельных видов изучены и охарактеризованы. Известно, например, что бычий соматотропин представляет собой полипептид, синтезированный внутри и выделенный из передней доли гипофиза. О нуклеотидной кодированной последовательности и последовательности аминокислот природного бычьего соматотропина сообщалось, например, Miller et al., S.Biol.Chem, 255, 7521-24 (1980); Wallis, FEBS Lett, 35, 11-14 (1973). Бычий соматотропин представляет собой белок из 191 аминокислот и, по-видимому, синтезируется первоначально в виде бычьего

пресоматотропина из 217 аминокислот; при этом, сигнальную последовательность из 26 аминокислот удаляют от N-концевого положения во время синтеза и выделения, например, Lingappa et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74, 2432-36 (1977).

Получение бычьего соматотропина хорошо известно в данной области. Например, бычий соматотропин экстрагируют из бычьих желез крупного рогатого скота или получают по технологии рекомбинантной ДНК в соответствующих хозяевах, например, Miller et al., F.Biol. Chem, 255, 7521-24 (1980). Патент США N 4443539, Frazur et al., раскрывает способ получения бычьего соматотропина путем использования методологии рекомбинантной ДНК, помещая структурный ген бычьего соматотропина в дрожжевые клетки. Пат. США N 4371462 раскрывает способ очистки передних гипофизных пептидов. Заявка на Евр. Пат. N 83304574.3, поданная 8 августа 1983, с номером публикации 103 395; N 82304880.6, поданная 16 сентября 1982, с номером публикации 075444; N 81303824.7, поданная 21 августа 1981, с номером публикации 047 600; заявка на Пат. Великобритании N 2073245 А раскрывают способы продуцирования бычьего соматотропина с высокими выходами. Штаммы E.Coli, которые продуцируют бычий соматотропин, имеются в American Type Culture Collection под регистрируемыми номерами ATCC 31826, 31840, 31841, 31842 и 31843.

Аналогично получение природного и рекомбинантного свиного и человеческого соматотропина хорошо известно. Например, в дополнение к вышеупомянутым публикациям, которые раскрывают способы получения свиного и человеческого соматотропина, Пат. США N 4604359 раск-

рывает способы микробиологической экспрессии человеческого соматотропина; Пат. США N 4332717 раскрывает способы очистки человеческого соматотропина; заявка на Евр. Пат. N 83305717.7, поданная 26 сентября 1983, с номером публикации 104 920, раскрывают способы продуцирования рекомбинантного свиного соматотропина с высокими выходами. Пат. США N 4604359 раскрывает способы синтеза биоактивного человеческого соматотропина, включая способы синтеза биоактивного тетра-S-карбамидометил производного. Многие такие публикации и способы для различных соматотропинов хорошо известны специалистам в данной области, например, Пат. США N 4645755 раскрывает способ продуцирования рыбьего соматотропина.

Хотя способы продуцирования соматотропинов хорошо известны, способы хранения соматотропина в течение длительного периода между получением соматотропина и его использованием развиты плохо. Соматотропины имеют тенденцию образовывать бионеактивные димеры, олигомеры и нерастворимые агрегаты во время хранения. Эти бионеактивные формы соматотропина понижают количество соматотропина, пригодного для использования, и вызывают проблемы во время приема, в частности, когда нерастворимые агрегаты образуют осадки в растворах соматотропина.

Поэтому существует потребность в способах получения стабильного и биоактивного соматотропина, который не будет образовывать бионеактивные димеры, олигомеры и агрегаты во время хранения.

Сущность изобретения.

Поэтому целью настоящего изобретения является разработка стабильного и биоактивного соматотропина, который не должен образовывать бионеактивные димеры, олигомеры и агрегаты в течение хранения.

Другой целью настоящего изобретения является разработка способа получения стабильного и биоактивного соматотропина, который не должен образовывать бионеактивные димеры, олигомеры и агрегаты во время хранения.

Следующей целью настоящего изобретения является разработка композиции, содержащей стабильный и биоактивный соматотропин, который не будет образовывать бионеактивные димеры, олигомеры и агрегаты во время хранения. Композиция должна быть пригодной в течение

длительного хранения, легко готовиться в дозах и легко применяться.

Эти и другие цели достигаются путем использования способа, который включает селективное восстановление дисульфидных связей в малой петле соматотропина, чтобы получить меркаптогруппы, и замещение меркаптогрупп в малой петле. Замещение меркаптогрупп в малой петле препятствует меркаптогруппам образовывать внутримолекулярные дисульфидные связи, которые вызывают образование димеров соматотропина, олигомеров и агрегатов и инактивируют соматотропин. Соматотропин, полученный с использованием этого способа, стабилен в течение длительного срока хранения и имеет биологическую активность, равную или большую, чем биологическая активность незамещенного соматотропина. Замещенный соматотропин выделяют и, при необходимости, подвергают дальнейшей обработке, чтобы получить форму соматотропина, пригодную для длительного хранения и последующего введения животному.

Другие цели, преимущества и новые признаки настоящего изобретения должны стать очевидными из последующего подробного описания изобретения.

30 Подробное описание изобретения.

Соматотропины, выделенные от различных видов животных, имеют высокую степень гомологии последовательности (около 96 процентов); однако соматотропины от различных видов все же отличаются количеством и последовательностью аминокислот, присутствующих в цепи соматотропина. Например, природный человеческий соматотропин (nhST) представляет собой полипептид, состоящий из 188 аминокислот. Молекула соматотропина имеет две дисульфидные связи; одна между 179 и 186 аминокислотами и одна между 68 и 162 аминокислотами. Эти дисульфидные связи образуют "малую петлю" из шести аминокислот и "большую петлю" из 94 аминокислот соответственно. Сложная последовательность и структура человеческого соматотропина, демонстрирующие "малую петлю" и "большую петлю" иллюстрируются в Пат. США N 3853832, включенном здесь ссылкой.

Аналогично природный свиной соматотропин (prST) представляет собой полипептид из 190 аминокислот, имеющий две дисульфидные связи, образующие характерные "малую петлю" и "большую петлю", одна между 180 и 188 аминокислотами и одна между 163 и 52 аминокислотами соответственно. Также природный

бычий соматотропин (nbST) представляет собой полипептид из 191 аминокислот, имеющий две дисульфидные связи, образующие характерные "малую петлю" и "большую петлю", одна между 181 и 189 аминокислотами и одна между 53 и 164 аминокислотами соответственно. Многочисленные синтетические и рекомбинантные соматотропины имеют различное число и различные последовательности аминокислот. Однако биоактивные соматотропины имеют третичную конформацию с характерными малой петлей и большой петлей.

Термин "соматотропин", используемый здесь, включает в себе любые соматотропины, имеющие "малую петлю" и включает не только "природные соматотропины", но также и "синтетические соматотропины" и "рекомбинантные соматотропины", имеющие аминокислотную последовательность природного соматотропина, аминокислотные последовательности, в основном сходные с ней, или форму ее укороченной последовательности, и их аналоги и мутеины, имеющие замещенные, изъятые, удлиненные, восстановленные или другим способом модифицированные последовательности. В частности, используемый здесь соматотропин включает рекомбинантный белок той же самой последовательности, как и природный соматотропин, но имеющий аминокислоты, изъятые из аминного и/или карбоксильного конца. Примеры таких белков включают (но не ограничиваются) дельта-7 рекомбинантный свиной соматотропин, дельта-4 рекомбинантный бычий соматотропин, природные соматотропины, имеющие 7 и 4 остатков, изъятых из аминного конца соответственно, и тому подобное.

Термин "соматотропин с замещенной малой петлей", используемый здесь, описывает "соматотропины", которые имеют "большую петлю", образованную дисульфидной связью, но не имеют "малую петлю"; причем меркаптогруппы "малой петли" замещают, чтобы предотвратить образование дисульфидных связей "малой петли". Соматотропин с замещенной "малой петлей" идентичен в аминокислотной последовательности незамещенному соматотропину за исключением присутствия замещающих групп на меркаптогруппах цистеина, которые обычно образуют дисульфидную связь, ответственную за "малую петлю".

Согласно настоящему изобретению способ предусматривает получение стабильного и биоактивного соматотропина.

Способ включает селективное восстановление дисульфидных связей "малой петли" соматотропина с получением меркаптогрупп и замещение меркаптогрупп "малой петли". Замещение меркаптогрупп "малой петли" препятствует меркаптогруппам образовывать внутримолекулярные дисульфидные связи, которые являются причиной образования димеров соматотропина, олигомеров и агрегатов и инактивируют соматотропин. Соматотропин, полученный с использованием этого способа, стабилен при длительном хранении и имеет биоактивность, равную или большую, чем биоактивность незамещенного соматотропина. Замещенный соматотропин выделяют и, при необходимости, подвергают дальнейшей обработке для того, чтобы получить форму соматотропина, пригодную для длительного срока хранения и последующего введения животному.

Используемый здесь соматотропин может быть получен из любого подходящего источника. Способы получения, выделения и очистки природных, синтетических и рекомбинантных соматотропинов хорошо известны в данной области. Соматотропин из любого вида животного может быть использован здесь; эти соматотропины включают (но не ограничиваются) человеческий, бычий, свиной, собачий, кошачий, лошадиный, птичий, рыбный и овечий соматотропины.

Дисульфидную связь малой петли соматотропина селективно восстанавливают взаимодействием соматотропина с соответствующим восстанавливающим агентом в условиях, при которых восстанавливаются дисульфидные связи "малой петли", но не восстанавливаются дисульфидные связи "большой петли". Любые пригодные восстанавливающие агенты, которые взаимодействуют с меркаптогруппами белка, могут быть использованы. Обычно восстанавливающий агент представляет собой любое органическое меркаптосоединение, представленное формулой R-SH, где R есть органический углеводородный радикал, имеющий около 1-30 углеродных атомов. Предпочтительные восстанавливающие агенты включают (но не ограничиваются) 2-меркаптоэтанол и дитиотреитол.

Обычно раствор, содержащий около 1-20 миллиграммов на миллилитр (мг/мл) соматотропина, смешивают с достаточным количеством восстанавливающего агента, чтобы довести концентрацию восстанавливающего агента до около 15-300 миллимоля (мМ), pH раствора доводят до

около 6-10 и восстанавливающий агент подвергают взаимодействию с соматотропином в течение около 0,5-3 часов при температуре около 15-50°C. Избыток восстановливающего агента удаляют любым подходящим способом, предпочтительно диализом, и образующийся восстановленный соматотропин с "малой петлей", содержащий две меркаптогруппы в "малой петле", подвергают замещению, как описано ниже.

В одном варианте осуществления изобретения, подходящее количество соматотропина растворяют в карбонатном буфере CB⁺ (CB⁺ содержит 25 мМ NaCO₃, 18 мМ Na₂CO₃, pH около 9,5), чтобы получить около 5 мг/мл раствора. Добавляют дитиотреит в количестве, достаточном для получения 20 мМ раствора, доводят pH до около 8 и осуществляют восстановление в темноте в течение около 1 часа при около 37°C.

В другом варианте осуществления изобретения, CB⁺ раствор (pH около 9,8) соматотропина с его концентрацией около 5 мг/мл, содержащий 2-меркаптоэтанол при концентрации около 50 мМ, подвергают взаимодействию в темноте в течение около 1 часа при около 20-37°C. Избыток восстановливающего агента удаляют и соматотропин подвергают замещению, чтобы получить стабильный и биоактивный соматотропин.

Меркаптогруппы "малой петли", которые являются результатом восстановления, замещают путем взаимодействия восстановленного соматотропина с соответствующим замещающим агентом. Замещающим агентом, используемым для замещения восстановленных меркаптогрупп "малой петли", может быть любой пригодный замещающий агент, который взаимодействует с меркаптогруппами. Специалисту в данной области известны многие классы замещающих групп, которые реагируют с меркаптогруппами.

Примеры таких классов включают, но не ограничиваются, замещающие агенты, такие как этиленмин, акрилонитрил, N-этилимид малеиновой кислоты, 3-бромпропионовая кислота, 3-бромпропионамид, иодацетамид, иодуксусная кислота, M-(иодэтил)-трифторацетамид, 4-винилпиридин, метил метантиосульфат. Наиболее предпочтительно, когда замещающим агентом является алкилирующий агент, имеющий формулу R-X, где X есть галоид, предпочтительно S, BR или Cl, и R является алкильной цепью, разветвленной или линейной, имеющей около 1-30 углеродных

атомов, предпочтительно около 1-12 углеродных атомов.

Обычно 1-200 мг/мл раствор восстановленного соматотропина с "малой петлей" смешивают с подходящим замещающим агентом до доведения концентрации замещающего агента до около 50-800 миллимолярной (мМ), pH раствора доводят до около 6-10 и замещающий агент подвергают взаимодействию с соматотропином в течение около 0,5-3 часов при температуре около 15-50°C. Избыток замещающего агента удаляют любым подходящим способом, предпочтительно диализом, и образующийся соматотропин с замещенной "малой петлей", содержащий две замещенные меркаптогруппы, подвергают обработке, чтобы получить соматотропин в форме, пригодной для длительного срока хранения и введения животному, обычно в лиофилизованной форме.

В предпочтительном варианте осуществления CB⁺ раствор с содержанием около 5 мг/мл соматотропина, восстановленного в малой петле, содержащий йодацетамид при концентрации около 200 мМ при pH около 8,5-9 подвергают взаимодействию в темноте в течение около 1 часа при около 20-37°C. Избыток йодацетамида удаляют диализом против 2% CB⁺. Образующийся замещенный соматотропин в дальнейшем очищают обычным способом, если необходимо, и лиофилируют с получением соматотропина, который является стабильным в течение длительного срока хранения и имеет биоактивность, равную или большую, чем биоактивность незамещенного соматотропина.

В соответствии с настоящим изобретением обеспечивается соматотропин с замещенной "малой петлей", который является стабильным в течение длительного срока хранения и имеет биоактивность, равную или большую, чем биоактивность незамещенного соматотропина. Замещенный соматотропин отличается от незамещенного соматотропина тем, что меркаптогруппы на цистеинах, которые образуют дисульфидную связь "малой петли", замещены, а меркаптогруппы на цистеинах, которые обычно образуют дисульфидную связь "большой петли", не замещены. Поэтому соматотропин с "малой петлей" имеет "большую петлю", типичную для незамещенного соматотропина, но не имеет "малой петли", поскольку замещенные меркаптогруппы не могут образовывать дисульфидные связи.

Соматотропин с замещенной "малой петлей" неожиданно имеет биоактивность,

равную или большую, чем биоактивность незамещенного соматотропина. Кроме того, соматотропин с "малой петлей" имеет дополнительное преимущество в том, что он не может образовывать внутримолекулярные дисульфидные связи между меркаптогруппами "малой петли", которые являются причиной образования димеров соматотропина, олигомеров и агрегатов и инактивации соматотропина. Поэтому соматотропин с замещенной малой петлей более стабилен в течение длительного срока хранения.

В другом аспекте настоящего изобретения обеспечивается разработка композиции, включающей смесь соматотропина с замещенной малой петлей в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями, такими как различные разбавители и связующие. Носитель может быть любым биосовместимым и носителем, совместимым с соматотропином с замещенной малой петлей, предпочтительно фосфат буферный солевой, Трис-HCl, аргинин, гистидин и тому подобное. В общем, любой биосовместимый раствор или носитель с pH между 6 и 11 должен функционировать в настоящем изобретении в качестве носителя для соматотропина с замещенной "малой петлей". Соматотропин с замещенной "малой петлей" смешивают с фармацевтически приемлемыми носителями с образованием композиции, которая является стабильной в течение длительного срока хранения и позволяет легко препарироваться в дозах и легко приниматься. Композиция предпочтительно является лиофилизированной формой соматотропина с замещенной "малой петлей" и носителя.

Настоящее изобретение, в основном, описано, следующие примеры иллюстрируют конкретные варианты осуществления изобретения и демонстрируют использование и преимущества его. Рекombинантный свиной соматотропин (RpST), используемый в примерах ниже, получают, используя *E.coli* микроорганизм, депонированный в American Type Culture Collection, Rockville MD, с регистрационным N 53031. Полное описание микроорганизма представлено в Пат. США N 4656255, включенном здесь ссылкой. Понятно, что данные примеры даны с целью иллюстрации, и подразумевается, что они не ограничивают описание изобретения или формулу изобретения каким-либо способом.

Пример 1. Пять (5) мг/мл растворы рекombинантного свиного соматот-

ропина (RpST) в карбонатном буфере (25 mM NaHCO₃, 18 mM Na₂CO₃, pH 9,8) восстанавливают в течение 1 часа при комнатной температуре в присутствии 0, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 mM 2-меркаптоэтанола (МЭ). Вслед за восстановлением каждый образец подвергают взаимодействию при комнатной температуре в темноте в течение 1 часа с 200 mM йодацетамида (ИА), чтобы заместить меркаптогруппы, полученные из восстановительных цистинов. Образцы анализируют методом SDS-PAGE.

Анализ SDS-PAGE геля показывает, что полное восстановление дисульфидных связей "малой петли" достигается при инкубации с 50 mM МЭ, в то время как дисульфидные связи "большой петли" остаются незатронутыми. Поскольку "малая петля" восстанавливается, имеется небольшое (1-2 мм) уменьшение в подвижности RpST, обусловленное "растяжением" C-концевой части петли. Такие изменения подвижности для сшитых белков по отношению к несшитым белкам по данным SDS-PAGE ранее сообщались Griffith, Biochem.S., 126, 553-560 (1972). Когда добавляют больше восстановителя, большая петля также восстанавливается, приводя к даже более сильному уменьшению подвижности (10-12 мм). Материал с восстановленной большой петлей существенно нерастворим, так как, когда материал, восстановленный в 30 mM МЭ, центрифугируют, только материал с незатронутой "большой петлей" остается в супернатанте. Эти результаты показывают, что приблизительно 40-50 mM МЭ дает оптимальный выход восстановленного в "малой петле" карбамидометилированного RpST.

Пример 2. Селективное восстановление дисульфидных связей малой петли дитиотреитолом.

Пять (5) мг/мл растворы рекombинантного свиного соматотропина (RpST) в карбонатном буфере (25 mM NaHCO₃, 18 mM Na₂CO₃, pH 9,25) восстанавливают в течение 1 часа в присутствии 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 100 mM дитиотреитола (ДТТ) в атмосфере азота при 37°C. После восстановления каждый образец подвергают взаимодействию при 37°C между pH 8,5-9,0 в темноте в течение 1 часа с 150 mM ИА, чтобы заместить меркаптогруппы, полученные из восстановленных цистинов. Избыточный/непрореагировавший ИА гасят небольшим молярным избытком ДТТ над ИА и диализуют в течение ночи против 0,1 M NH₄HCO₃, pH 7,8-8,2. Диализованный RpST анализируют пептидным картированием после 2 часового

гидролиза с ТРСК-обработанным трипсином. Результаты показаны в табл. 1.

В табл. 1 использованы следующие сокращения:

время удержания (ВУ) каждой НРЛ С дано в минутах;

/Т-Х/ = каждую зону анализируют и обозначают как трипсиновый пептид согласно положению, начиная от аминоконцевой части последовательности;

/Т-Х+Т-У/ = два трипсиновых пептида связаны ковалентно дисульфидным мостиком;

в немодифицированном рST "малая петля" состоит из двух трипсиновых пептидов Т-23 и Т-25, которые ковалентно связаны дисульфидной связью, аналогично в большой петле связаны Т-5 и Т-18;

х = Т-1 зона также элюируется в этом положении;

хх = восстановленные цистеины замещают ИА;

разделение 100 μ г трипсинового продукта варки RpST достигается на Аквапоре С-8 колонке RP-HPL С (Brown-Lee), которую предварительно уравнивают 0,1% трифторуксусной кислотой (ТФК) и элюируют при 0,5 мл/мин 50% 2-пропанолом в 0,1% ТФК.

Согласно табл. 1 результаты показывают, что полное восстановление дисульфидных связей "малой петли" достигается инкубацией с 20 мМ ДТТ, в то время как дисульфидные связи "большой петли" остаются незатронутыми. Это далее подтверждается, как показано в Примере 3.

П р и м е р 3. Характеристика соматотропина с замещенной "малой петлей"

Незамещенный RpST и RpST с замещенной малой петлей, полученный согласно способу Примера 1, варят в течение двух часов, используя трипсин. Продукты варки с трипсином анализируют, используя жидкостную хроматографию под высоким давлением с обращенной фазой (RP-HPL С). Результаты показывают зоны НРЛ С с временами удерживания 40,4 и 98 минут, соответствующие "малой петле" и "большой петле" соответственно. Однако после селективного восстановления и карбамидометилирования "малой петли", НРЛ С зона с временем удерживания 40,4 минут полностью исчезает с сопутствующим появлением двух зон с временами удерживания 3,6 и 50,9 минут. Анализы новых НРЛ С зон с помощью автоматизированного разложения по Edman подтверждают, что модифицированный RpST образец, содержит RpST с замещенной "ма-

лой петлей", как предсказано. Данные для аминокислотной последовательности для незамещенных и замещенных в малой петле трипсиновых пептидов представлены в табл. 2. Дополнительное доказательство для карбамидометилирования двух цистеинов модифицированного RpST получено с помощью аминокислотного анализа. Значение 1,6 карбоксиметил цистеинов (СМС) вместо 2 для теоретического замещения в одной петле получено. Эти результаты представлены в табл. 3.

П р и м е р 4. Биоактивность замещенного соматотропина.

Биоактивность незамещенного RpST и RpST, замещенного в малой петле, полученного согласно способу Примера 1, определяют с помощью проб по связыванию рST, используя мембраны печени беременного кролика и RpST, меченый 125 I. Модифицированная версия пробы, раскрытая Tsushima et al., Radioreceptor Assay for Growth Hormone, F. Clin. Endocrinol. Metab. 37:334-337 (1973), использована: Образец RpST инкубируют при 30°C в течение 3,5 часов с 125 I-RpST с числом распадов 16000 в минуту. Область концентрации, используемой для кривой замещения RpST стандарта и RpST, замещенного в малой петле, находится между 0,38-200 нг/мл. Дополнительная информация для пробы по связыванию рST описана Tsushima et al., Radioreceptor Assay for Growth Hormone, F. Clin. Endocrinol. Metab. 37:334-337 (1973). Результаты показывают, что рассчитанная концентрация иода при 50% (IC-50) рST, карбамидометилированного в малой петле, составляла 1,24 нг/0,5 мл эквивалента связывания, тогда как незамещенный и диализованный образцы давали значение 3,0 нг/мл и 2,9 нг/0,5 мл соответственно. Стандарт дает IC₅₀ 2,35 нг/0,5 мл. Из этих данных, как рассчитано, процент 181%, в противоположность значению около 75% для незамещенного соматотропина.

П р и м е р 5. Биоактивность замещенного соматотропина.

Биоактивность незамещенного RpST и RpST, замещенного в малой петле, полученного согласно способу Примера 1, определяют, используя связывающую активность в мембранах печени свиньи согласно модификации способа Haro et al., Homologous Somatotropin Radioreceptor Assay Utilizing Recombinant Bovine Growth Hormone, Mol. Cell Endocrinol. 38:109-116 (1985). Результаты показывают, что рассчитанное IC-50 рST, карбамидометилированного в малой петле, составляет

1,29 нг/0,5 мл по сравнению 1,61 нг/0,5 мл для незамещенного pST и RpST стандарта. Результаты показывают, что замещенный RpST имеет 125% активность по сравнению с 100% для немодифицированного (незамещенного) RpST. Эти результаты показывают неожиданно высокое связывание, что соматотропины, полученные согласно настоящему изобретению, не только более стабильны, но и более биологически активны, чем их немодифицированные предшественники соматотропинов.

Пример 6. Биоактивность и биопотенция замещенного соматотропина.

Относительная биоактивность и биопотенция незамещенного RpST и RpST, замещенного в малой петле, полученного по способу Примера 1, определяют путем измерения прироста веса тела у гипофизэктомизированных (гипокс) крыс. Четыре (4) группы, по 10 гипокс крыс в группе получали 24 μ г pST/день стандартный pST, диализованный Zn-RpST, Zn-RpST, замещенный в "малой петле", или незамещенный Zn-RpST в течение 9 дней. Крыс контролировали ежедневно и приросты веса их тела записывали на протяжении периода 10 дней. Прирост веса измеряли и рассчитывали относительную биоактивность в процентах, как процент от стандарта. Результаты показаны в табл. 4.

Согласно табл. 4, данные показывают, что замещенный RpST дает значение прироста веса в процентах 13,5% по сравнению с 14,4% для незамещенного RpST. Кроме того, данные демонстрируют, что карбоксиконцевая часть "малой петли" не требуется для соматотропина, чтобы ускорять рост.

Пример 7. Стабильность раствора замещенного соматотропина.

Растворы 8 мг/мл незамещенного RpST и RpST, замещенного в малой петле (полученного с ИА согласно Примеру 1), содержащие 0,5% азида натрия, готовят либо в 46 мМ карбонатном буфере (pH 9,8), либо в фосфатном буфере (pH 7,4). Аликвотные пробы по 1,25 мл инкубируют в микроцентрифужных труб-

ках Eppendorf в течение 0,6, 4,6, 8,8, 22 и 120 дней при 37°C.

В конце каждого инкубационного периода аликвотные пробы удаляют и анализируют на RpST мономер, используя Superose-12 Size - вытеснительную хроматографию с подвижной фазой 15 мМ карбонатного буфера (pH 9,8). Относительное количество мономера, димера и образующихся агрегатов с более высокой молекулярной массой показывает, что имеется более высокое процентное содержание мономера, выделяемого при восстановлении и замещении малой петли.

Пример 8. Стабильность замещенного соматотропина во влажном состоянии

Незамещенный RpST и RpST с замещенной "малой петлей" (полученный с ИА согласно Примеру 1), содержащий 5 мг/мл, диализуют против 0,46 мМ карбонатного буфера и лиофилизируют, получая сухие RpST образцы для дальнейшего испытания. Пять мг сухих замещенного в малой петле и незамещенного RpST увлажняют 0,01 мл 50 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 0,05% азида натрия или 46 мМ карбонатного буфера, pH 9,8, 0,05% азида натрия. Пасты подвергают инкубации в течение 14 дней при 37°C. По окончании этого времени RpST разбавляют до конечной концентрации около 1,8 мг/мл в 46 мМ карбонатном буфере, pH 9,8, гомогенизируют в ультразвуковом гомогенизаторе Branson 220 в течение нескольких минут и центрифугируют при 15000 X G в течение 5 минут. Супернатант анализируют на содержание мономера методом хроматографии, описанным в Примере 6. Результаты показывают, что выделение RpST мономера было много больше для RpST, замещенного в "малой петле", независимо от pH при увлажнении, по сравнению с незамещенным RpST.

Очевидно возможны многие модификации и вариации настоящего изобретения в свете вышеупомянутых указаний. Поэтому следует понимать, что не выходя за рамки объема формулы изобретения изобретение может быть осуществлено иначе, чем, в частности, описано.

Т а б л и ц а 1

Поведение удерживания трипсиновых пептидов, ассоциированных с малой и большой петлями рST

Образец	Малая петля (ВУ мин)	Большая петля (ВУ мин)
немодифицированный (T-5+T-18)	40,4 (T-23-T-25)	98,0
восстановленный (Малая петля только) (T-5+T-18)	3,6 (T-23), 45,0 (T-25)	98,0
восстановленный (T-5), (Малая и большая петли) (T-18)	3,6 (T-23) 45,0 (T-25)	80,6* 60,0
замещенный** (Малая петля только) (T-5+T-18)	3,6 (T-23) 50,9 (T-25)	98,0
замещенный** (T-5), (Малая и большая петли) (T-18)	3,6 (T-23) 50,9 (T-25)	85,6 74,3

Т а б л и ц а 2

Аминокислотная композиция + немодифицированного и модифицированного RpST

Аминокислота	Немодифицирован- ный образец, моль/моль	Модифицированный образец, моль/моль	Теоретическое значение
ASP	16,5	17,0	16
THR	7,6	7,7	8
SER	12,3	12,6	14
GIU	26,8	27,7	25
PRO	6,1	5,7	5
CLY	8,0	8,0	8
ALA	17,0	15,7	16
CYS*	3,8	2,4	4
VAI	7,6	5,3	8
MET	1,8	1,7	22
ILE	5,5	5,5	24
LEU	23,3	23,2	24
TYR	6,7	6,8	7
PHE	11,6	11,7	12
LYS	10,3	12,6	11
HIS	5,0	5,0	3
APG	12,6	12,6	13
CMC**	0	1,6	CM.CY
Всего	182	182	182

+— Определенная аминокислотным анализом после 24-часового гидролиза.

CYS*— Это значение получают как цистин и умножают на фактор 2, чтобы получить значение цистеина (выраженное как моль/моль).

CMC**— Значение карбоксиметилированного цистеина рассчитывают путем использования соответствующего стандарта.

Т а б л и ц а 3

Анализы аминокислотной последовательности HPL C зон, представляющих пептиды малой петли и карбамидометилированного T-23

Цикл	PTH-остаток	Количество (пМол)/(пМол)	PTH-остаток	Количество (пМол)
1	PHE	609	Пропуск	-
2	VAI	638	ARG	113
3	GLU	243	ARG	109
4	SER	223	Пропуск	-
5	SEP	154	Пропуск	-
6	CYSTINE(-S-S-)	(++)*	Пропуск	-
7	ALA	214	Пропуск	-
8	PHE	116	Пропуск	-
9	Пропуск	-	Пропуск	-

*Цистин-PTH элюирует при 14,8 минутах. Точное количество не рассчитано из-за недоступности цистин-PTH стандарта. Поскольку два PTH-остатка освобождаются во время 2-ого и 3-его циклов Эдмана, также установлено, что после 2 часов гидролиза трипсином карбокси-конечная часть ARG-ARG аминокислот не расщепляется. Трипсин не может гидролизовать эти связи. Представляется также, что Cystine-ARG связь устойчива к гидролизу трипсином.

(A) ВУ HPL C зоны: 40,5 из пептидной карты немодифицированного RpsT.

(B) ВУ HPL C зоны: 50,9 из пептидной карты модифицированного в малой петле RpST.

Продолжение табл. 3

Цикл	PTH-остаток	Количество (пМол)
1	PHE	114
2	VAI	54
3	GLU	44
4	SER	++
5	SEP	++
6	CAM-CYSTEINE*	(++)**
7	ALA	56
8	PHE	37
9	Пропуск	-

*Появление новой PTH зоны при ВУ: 9,24 обусловлено карбамидометилцистеином.

**Количество не рассчитано из-за недоступности CAM-Cy PTH стандарта.

Т а б л и ц а 4

Определение биоактивности свиного соматотропина

Соматотропин (ST)	Доза	% весового значения	Прирост СО	% относител. биоактивности*
pST стандарт	24	23,1**	2,9	55***
Диализованный Zn-RpST	24	14,4**	2,5	62
Замещенный в малой петле Zn-RpST	24	13,5**	2,8	58
Не замещенный Zn-RpST	24	17,1**	2,2	74

*Относительно гипофизарно полученного pST стандарта, испытанного при аналогичной концентрации.

**Значительно более высокий ($P < 0,01$), чем отрицательный контроль (4,6%). Стандартное отклонение (СО) 3,4.

***При эквивалентной дозе, когда ST растворяют в буфере с высоким 9,5 pH, его относительная биоактивность составляет 51 %.

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор Л.Пчолинська

Замовлення 536

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

