

Винахід стосується галузі медицини і може бути використаний для створення ліків.

Новий напрямок, що народився майже десять років тому і який дістав активний практичний вихід за останній час, присвячено створенню лікарських засобів нової генерації, зміст якої полягає у безпосередній доставці ліків до клітини. В основу такого напрямку покладено особливість високо-афінної взаємодії комплексу "ліганд-рецептор", учасниками якого є, з одного боку, різноманітні ліганди, що є своєрідною "адресою" для посадки на рецептори, а з іншого - специфічний спектр рецепторних білків цитоплазматичної мембрани клітини, які мають відповідні ділянки, що "впізнають". Використання таких природних можливостей організмів дало передумови для розробки і створення ряду лікарських засобів білкової природи, т.з. fusion-білків, що мають специфічні адресні частини. Змінивши адресну частину, можна "примусити" потрібний рецептор клітини "впізнати" ліганд, що містить нову адресну частину, використовуючи т.з. феномен "адресної доставки".

Найбільша перевага в цьому розумінні віддається бактеріальним токсинам, здатним пошкоджувати клітину господаря, тим або іншим чином викликаючи її загибель. Даний винахід стосується імунотоксину на основі білка, токсична частка якого представлена каталітичною і трансмембранною частками дифтерійного токсину (DT), а адресна частина - інтерлейкіном 2 людини (IL-2).

Даний білок має як цитотоксичну дію по відношенню до клітин-продуцентів рецептора IL-2, так і імуносупресивну дію. Отже, він може бути застосований для лікування таких патологій, як Т-клітинний лейкоз, лімфогранулематоз, різноманітні аутоімунні захворювання, в т.ч. діабет 1 типу, ревматоїдний артрит і т.п., а також при трансплантації органів і тканин.

Найбільш дослідженим об'єктом, що несе сильний токсичний початок, є дифтерійний токсин (DT) з *Corynebacterium diphtheriae*. Він має три структурно-відокремлених домена, що володіють різноманітними функціями [2]. На фіг.1 представлено просторову структуру DT. Зокрема, каталітичний домен відповідає за ADP-рибозилування фактора елонгації 2, що призводить до порушення роботи білоксинтезуючого апарату клітини і, в подальшому, до її загибелі. Трансмембранний домен несе гідрофобні, мембранно-асоційовані ділянки, що проникають через мембрану; він потрібний для транслокації каталітичної частки токсину в цитозоль клітини. Рецепторний домен служить для впізнання токсину клітиною через відповідні поверхові рецептори, проникаючи в клітину у відповідь на зниження рН в ендосомі [1.3]. В нормі таким рецептором є гепарин-зв'язуючий епідермальний фактор зростання (HB-EGF-like) [4]. Послідовне розташування всіх доменів представлено на фіг.2.

До нинішнього моменту у світі накопичено досить широкий матеріал, що стосується як структурних, так і функціональних особливостей рекомбінантних імунотоксинів, у тому числі створених і на основі дифтерійного токсину. Різноманітність генетичних форм химерних токсинів зумовлена пошуком найбільш оптимальної конструкції як з точки зору її токсичності, так і високої афінності взаємодії з рецептором. В зв'язку з цим існуючі рекомбінантні токсини відрізняються, по-перше, адресною частиною, по-друге, якістю точкових амінокислотних замін, спрямованих на підвищення активності знову синтезованого білка і, по-третє, довжиною лінкеру, що з'єднує ферментно-трансмембранну частину токсину з " новою " адресою.

Відомі імунотоксини на основі DT, в яких N-термінальний фрагмент токсичної частини представлений двома першими доменами і характеризується, в основному, двома варіантами послідовностей, довжиною 389 і 486 амінокислотних залишків. Крім адресних частин, вони відрізняються довжиною лінкеру, що з'єднує трансмембранний домен DT і знов приєднану послідовність адреси [5].

Найбільш близьким за технічною суттю і результатом, що досягається, до запропонованого винаходу є рекомбінантний імунотоксин на основі DT і IL-2, в якому токсична (каталітично-трансмембранна) частина (DT) має довжину 389 амінокислот та спосіб його одержання, який полягає в конструюванні плазміді рDT123, і клонування фрагмента послідовності інтерлейкіну 2 [6].

У вищезазначеному технічному вирішенні для експресії та нароботки злитого білка використовувався штам-продуцент на основі *E.coli*. Однак, це може потягти за собою ряд проблем. По-перше, використання тілця включення для експресії створює чисто технологічні труднощі, що стосуються виділення, очищення і стабільності химерного білка. По-друге, як грам-негативна бактерія оболонка *E.coli* містить токсичні ліпополісахариди, якими може забруднюватися препарат. Крім того, система протеолізу в *E.coli* налаштована на розпізнання "свій-чужий", тому існує висока ймовірність протеолітичного розщиплення гібридного білка, що тягне за собою сегрегаційну і структурну нестійкість і, як наслідок, зниження продуктивності рекомбінантної популяції.

Завданням данного винаходу є створення злитого білка DT-IL2 та розробка способу його одержання, що дозволяє забезпечити високу токсичність і здатність секретуватися у позаклітинний простір. Поставлене завдання вирішується рекомбінантним імунотоксином, що описується та який містить каталітичну і трансмембранну частки дифтерійного токсину довжиною 482 амінокислоти і адресну частину, представлену інтерлейкіном 2 людини і який має амінокислотну послідовність:

MSRKL FASILIGALLGIGAPPSAHAGADD  
 VVDSSKSFVMENFSSY  
 HGTKPGYVDSIQKGIQPKSGTQGN YD  
 DDWKGFYSTDNKYDAAGY  
 SVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLA  
 LKVDNAETIKKELGLSL  
 TEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSL  
 PFAEGSSSVEYINNWEQ  
 AKALSVELEINFETRGRGQDAMY EYM  
 AQACAGNRVRRSVGSSLS  
 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNK  
 MSES PNKT VSEEKAKQ  
 YLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVF  
 AGANYAAWAVNVAQVID  
 SETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADG  
 AVHHNTEEI VAQSIAL  
 SSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESI  
 NLFQVVHNSYNRPAY  
 SPGHKTQPF LHDGYAVSWNTVEDSIIR  
 TGFQGESGHDIKITAENT  
 PLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG  
 RKIRMRCRAIDGDVTF  
 CRPKSPVYVGNGVAPTSSSTKKTQLQL  
 EHLLDLQMLNGINNYK  
 NPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLE  
 EELKPLEEVLNLAQSKN  
 FHLRPDLISNINVIVLELKGSETTFMCE  
 YADETATIVEFLNRWI  
 TFCQSIISTLT

Поставлене завдання вирішується також описуванням способом одержання рекомбінантного імунотоксину DT-IL2, який містить конструювання гібридної плазмиди на основі вектора pBR 322 по сайтах рестрикції EcoRI-HindIII, точковий мутагенез для одержання ApaI сайту в районі 482 амінокислотного залишку DT шляхом заміни останнього тиміну в сайті gtgcat на цитозин, модифікацію білок-синтезуючого апарату штаму-продуцента PW8 введенням необхідної тРНК, що зв'язує утворену тРНК з лейциновим кодоном cta IL2, клонування фрагмента послідовності IL2 по сайтах ApaI-ApaI з наступним введенням одержаного фрагмента в ApaI-сайт вектора pSUL17M, сортування, клонування і відбір канонічних клонів, що містять шуканий рекомбінантний імунотоксин DT-IL2.

Створення винаходу ґрунтується на вивченні довжини лінкеру імунотоксину, яке дозволило зробити висновок, що він не повинен бути занадто великим, тому що дещо змінена трьохвимірна структура імунотоксину в результаті приєднання "чужого" домену може сприяти посиленню протеолітичної деградації імунотоксину. Для двох відомих варіантів рекомбінантних токсинів довжина такого лінкеру складає 2 і 99 амінокислот відповідно. При конструюванні також необхідно було врахувати, що лінкерна ділянка не повинна містити сайту, відповідального за зв'язування з рецептором до нативного дифтерійного токсину (дикого типу). Така ділянка починається в районі 482 залишку. Таким чином конструкція, що пропонується, названа DT482-IL2, містить більш короткий лінкер, що сприяє, з одного боку, більшій стійкості до протеазів, а з іншої - дозволяє адресній частині бути більш гнучкою, що сприяє підвищенню афінності взаємодії з рецептором. Більш того, запропонована конструкція, на відміну від відомої, дозволяє зберегти каталітичне важливі амінокислотні залишки, Ser466 і Arg458, які є невід'ємною частиною активного центру.

Таким чином, винахід, що пропонується, має такі переваги перед існуючими аналогами, у тому числі прототипом. По-перше, лінкер характеризується збереженням всіх амінокислотних залишків, необхідних для виконання каталітичної функції активного центру. По-друге, продуцент, обраний нами для виробництва злитого білка, є більш переважним, ніж E.coli. Зокрема, імунотоксин, що синтезується, секретується у позаклітинний простір, що технологічно більш ефективно, і крім того, штам PW8, що використовується, дозволений для промислового застосування.

На фіг.1 показана трьохвимірна структура дифтерійного токсину, виконана з використанням програми-візуалізатора WebLab Viewer [7] (координати атомів взяті з Брукхевенського банку даних [8]). На фіг.2 - трьох-доменна організація дифтерійного токсину: С-каталітичний, Т-трансмембранний, R-рецепторний домени відповідно. Числа вказують номери амінокислот, відповідні доменам. Нумерація амінокислотних залишків відповідає зрілому білку, що не має сигнальної послідовності (перші 25 залишків не беруть участі в нумерації). На фіг.3 дана первинна послідовність рекомбінантного білка. Сигнальну послідовність виділено курсивом, інтерлейкінову частину - дрібним шрифтом.

Кращий варіант здійснення винаходу.

Спосіб конструювання злитого білка DT482-IL2 має такі стадії:

1. Отримання гібридної плазмиди PSUL17.

Після індукції бактеріофагу  $\beta$  налیدиксовою кислотою було проведено виділення ДНК цього бактеріофагу, що містить повну послідовність дифтерійного токсину. Після обробки одержаної ДНК рестриктазами EcoRI-HindIII проводять виділення фрагменту, кодуєного DT. На наступному етапі проводять уведення виділеного фрагменту ДНК DT в плазмиду pBR322 по вказаних сайтах рестрикції для одержання гібридної плазмиди pSUL17.

2. Точковий мутагенез для отримання ApaI сайту.

З метою створення злитого білка DT-IL-2 і враховуючи структурно-функціональні особливості обох білків, використовують ApaI сайт як "стикувальний вузол" між каталітично-трансмембранною частиною DT і IL-2. Останній має даний унікальний сайт на 5'-кінці. Що стосується послідовності DT, то в районі 482 залишку є ділянка gtgcat (Val482His483), у якій заміна одного нуклеотиду також призведе до одержання ApaI сайту, gtgcac.

3. Модифікація білок-синтезуючого апарату штаму PW8.

Оскільки як штам-продуцент використовують PW8 *Corynebacterium diphtheriae*, то необхідно врахувати особливості білок-синтезуючого апарату даного продуцента з метою подальшого безпомилкового синтезу злитого білка, що містить інтерлейкін-2 людини. Було з'ясовано, що пул лейцинових кодонів ста IL-2 є мінорним для *Corynebacterium diphtheriae*. В зв'язку з цим необхідно видозмінити білок-синтезуючий апарат, для чого уводимо у хромосому штаму-продуцента ген потрібної tPHK так, щоб tPHK, що утворюється, була здатна зв'язуватися з вищезазначеним кодоном.

4. Клонування кодуєного фрагмента послідовності IL-2.

Після виділення тотальної мРНК IL-2 з культури тимоцитів людини проводять полімеразну ланцюгову реакцію, сполучену із зворотною транскрипцією (праймери 5'GTGCACCTACTTCAAGT3' і 3'GGGGTGCACTTAATTATCAAGTTAGTG 5'AMV-ревертаза, PFU-1-полімераза для ПЦР). Отримані амплікони обробляють рестриктазою ApaI. Після виділення необхідного фрагмента ДНК проводять уведення ApaI-ApaI фрагмента в ApaI-сайт pSUL17M. Отримані таким чином гібридні плазмиди, що відрізняються напрямком вбудованого фрагмента, піддають сортуванню і клонуванню для відбору канонічних клонів, що містять шуканий злитий білок (pSUL178).

5. Проведення трансформації клітин потрібного лізогену PW8 по бактеріофагу  $\beta$  плазмидою pSUL178.

6. Здійснення селекції стабільних клонів, що секретують шуканий білок DT482-IL2.

В результаті здійснення способу отримано цільовий продукт, що має амінокислотну послідовність, представлену на фіг.3.

Таким чином, генно-інженерна конструкція, що пропонується, дозволяє одержувати злитий білок найбільш ефективним способом, який може бути легко адаптований до існуючих промислових технологій. Препарат DT482-IL2 має як протипухлинну активність, знищуючи малігнізовані Т-клітини, так і імуносупресивну активність, що може бути використане при лікуванні аутоімунних захворювань та трансплантації органів і тканин.

Джерела інформації

1. Bell, C.E., Eisenberg, D. (1996) Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* 35, 1137 - 1149.

2. Bennett, M.J., Choe, S. Eisenberg, D. (1994) Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* 3, 1444 - 1463.

3. London, E. (1992) How bacterial protein toxins enter cells: the role of partial unfolding in membrane translocation. *Mol. Microb.* 22, 3277 - 3282.

4. Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., Mekada, E. (1995) Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 270, 1015 - 1019.

5. Shaw, J.P., Akiyoshi, D.E., Arrigo, D., A., Rhoad, A.E., Sullivan, B., Thomas, J., Genbauffe, F.S., Bacha, P., Nichols, J.C. (1991) cytotoxic properties of DAB<sub>486</sub>EGF and DAB<sub>389</sub>EGF, epidermal growth factor (EGF) receptor-targeted fusion toxins. *J. Biol Chem.* 266, 21118 - 21124.

6. Заявка RU №93055180, Бюл. №23, 1996.

7. WebLab Viewer; <http://www.msi.com>.

8. Bernstein, F.C., Koetzie, T.F., Williams, G.J.B., Meyer Jr. E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard. O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535 - 542.



Fig. 1

1-190	191-386	387-535
C	T	R

Fig. 2

MSRKL FAS I L I G A L L G I G A P P S A H A G A D D V V D S S K S F V M E W S S Y H G  
TKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGN YDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDN  
ENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLME  
QVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVEL  
EINFETRGRGQDAMYEYMAQAÇAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIR  
DKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKT VSEEKAKQYLEEFHQTALEH  
PELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAAL  
SILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEI VAQSIALSSLMVAQAIPLVGELV  
DIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSW  
NTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDV NK  
SKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVaptsSStkk  
tqlql lehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfymppkkatelkhl  
qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettf  
mceyadetativeflnrwitfcqsiistlt

Фиг. 3