

(19)



(10) **LT IP1529 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP1529**

(51) Int. Cl. (2006): **A61K 38/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 06**

A61K 38/22

A61P 25/00

C07K 14/00

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

C07K 14/435

C07K 14/82

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

C07K 19/00

C12N 15/00

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

C12N 15/16

C12P 21/02

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

C12Q 1/68

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **564929, 1990 08 08, US**

PCT/US91/05610, 1991 08 07, US

5011316, 1992 01 31, SU

(71) Pareiškėjas:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., 777 Old Saw Mill Road, Tarrytown,
NY 10591-6707, US**

(72) Išradėjas:

Eric M. SHOOTER, US

Ulrich SUTER, US

Nancy IP, US

Stephen P. SQUINTO, US

Mark E. FURTH, US

Ronald M. LINDSAY, US

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

—

(54) Pavadinimas:

Chimerinis neurotropinis faktorius, farmacinė kompozicija, nukleino rūgštys

(57) Referatas:

—

CHIMERINIS NEUROTROFINIS FAKTORIUS, FARMACINĖ KOMPOZICIJA, NUKLEININĖS RŪGŠTYS

Šis išradimas susijęs su chimeriniais neurotrofiniais faktoriais, molekulėmis, į kurias įeina dalis gamtinės kilmės faktoriaus ir dalis, bent jau vienos kokios tai kitos molekulės, taip kad gauta chimerinė molekulė įgauna neurotrofinį aktyvumą. Išradimas remiasi, dalinai, išradimu to, kad chimerinės molekulės, turinčios dalis dviejų skirtingų neurotrofinių faktorių, išlaiko iš esmės pilną biologinį aktyvumą ir, bent jau kai kuriais atvejais, įgauna unikalią diapazoną neurotrofinio aktyvumo, kuriame viena molekulė turi aktyvumą abiejų tėvinių molekulių.

2.1. CHIMERINIAI CITOKINAI

Kai kurios organizmo ląstelės sugeba gaminti faktorius, vadinamus citokinais, kurie veikia kaip ląstelių ryšininkai, (mesendžeriai) tuo pačiu koordinuoja biologines funkcijas. Pavyzdžiui, limfocitai gali gaminti limfokinus, faktorius, kurie sąveikauja su įvairiais imuninės sistemos komponentais ir jų tikslas yra efektyviai valdyti imuninį atsaką. Neurotrofiniai faktoriai tai yra citokina, kurie gali skatinti nervų sistemos komponentų išgyvenimą ir/arba diferencijaciją.

Kaip tarpląsteliniai ryšininkai, citokina paprastai sąveikauja su specifinėm ląstelių populiacijom per citokinų receptoriaus molekules. Tokiu būdu, citokinas nutaikytas į tam tikras receptorių-nešančias ląsteles. Parodyta, kad citokina gali būti panaudoti su tikslu įvesti toksines medžiagas į ląstelių populiaciją, surišant citokiną su toksine medžiaga. Pavyzdžiui, Siegall et al. (1989, Fed. An. Soc. Exp. Biol. 3:2647-2652) susintetino kDNR, koduojančią citokiną transformuojantį augimo faktorių alfa, su 5'-galu geno, koduojančio modifikuotą formą ekzotoksino A *Pseudomonas*, kuriam buvo panaikintas ląstelinio atpažinimo domenai. Gauta chimerinė molekulė buvo ekspresuota į *Escherichia coli*, išskirta ir, kaip pastebėta, buvo ypač citotoksiška ląstelėms, specifiskai ekspresuojančioms epiderminio augimo faktoriaus receptorių. Ogata et al. (1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:4215-4219) gavo rekombinantinį chimerinį toksiną, kuriame surišantis ląstelinis ekzotoksino *Pseudomonas* (PE) domenai buvo pakeistas pelės limfokino interleukinu 4 (IL-4); nustatyta, kad chimerinis baltymas IL-4-PE40 yra citotoksiškas receptorių-nešančioms pelės IL-4 ląstelinėms linijoms. Banker et al. (1989, J. Cell Physiol. 139:51-57) aprašė chimera ricino A grandies ir epiderminio augimo faktoriaus. Williams et al. (1987, Protein Eng. 1:493-498) pakeitė difterijos toksino receptorinio surišimo domeną sintetiniu genu, koduojančiu interleukiną 2 (IL-2) ir transliacinį stop-signalą. Nustatyta, kad difterijos toksino susiliejiimo su IL-2 baltymas selektyviai slopina baltymų sintezę receptorių-nešančiose ląstelėse IL-2, tada kai ląstelinės linijos, neekspresuojančios receptorių IL-2, yra rezistentinės toksino poveikiui.

Kiti tyrinėtojai sukonstravo molekules rekombinantinių DNR, kurios įjungia citokino geną, o taip pat, bent jau dalį bakterinio geno. Dicou et al. (1989, J. Neurosci. Res. 22:13-19) susintetino pilną DNR pelės prepro-nervo augimo faktoriaus su karboksiliniu galu beta-galaktozidazės geno *Escherichia coli*, o taip pat susintetino fragmentą genomines DNR, atitinkantį kodonams žmogaus nervų augimo faktoriaus 11-106 geno, su penktu kodonu beta-galaktozidazės amino galo. Abu bakteriniai vektoriai asocijavosi su didelių kiekių chimerinių baltymų ekspresija. Nors po bakterinių ląstelių lizės didesnė dalis pelės prepro-nervo augimo faktoriaus pasirodo netirpi, pagrindinė dalis žmogaus chimerinio beta-nervinio augimo faktoriaus, matyt, yra supernatante. Neurotrofinis aktyvumas, tačiau, nebuvo pateiktas šiuose darbuose.

Nesenuose tyrimuose, Ibanez et al. (1990, EMBOJ. 9:1477-1483) aprašo bandymus, atliktus su nervų augimo faktorium, veikiant su sait-kryptine mutageneze. Xie et al. (1990, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:3180-3184) aprašo panaudojimą chimerinių opioidinių peptidų, tiriant opiatinius receptorių. Ray et al. (1990, Mol. Endocrinol. 102:101) aptaria receptorių-surišančio specifiskumo

pakitimus atžvilgiu augimo hormono specifiškumo, vykstančius rezultate genominių ekzonų pakeitimo. Cunningham et al. (1990, Science 247:1330) sistemingai keitė augimo hormono dalis su tikslu identifikuoti mutantinius hormonus, kurie galėtų prarasti gebėjimą surišti augimo hormono receptorių. Cunningham et al. (1990, Science 247:1461) tyrė sąit-kryptinę prolaktino mutagenę, duodančią prolaktino varijantą, kuris sugeba susirišti su augimo hormono receptoriumi.

2.2. NEUROTROFINIAI FAKTORIAI

Nervų sistemos vystymasis ir išgyvenimas priklauso nuo baltymų, žinomų kaip neurotrofiniai faktoriai. Plačiai išplitusi nervinių ląstelių mirtis lydi normalų vystymąsi centrinės ir periferinės nervų sistemos ir, matyt, turi sprendžiamą vaidmenį neuronų, kurie projektuojasi į duoto taikinio sritį, skaičiaus reguliavime (Berg, D.K., 1982, Neuronal Development 297-331). Ekstirpaciniai ir transplantaciniai periferinių audinių-taikinių vystymosi tyrimai rodo, kad nervinių ląstelių mirtis vyksta rezultate konkurencijos tarp neuronų dėl ribojimo išgyvenimo faktorių ("neurotrofinių faktorių") kiekio, gaminamų jų projekcijų srityse. Dabar žinomi keturi svarbiausi identifikuoti neurotrofiniai faktoriai. Tai nervinio audinio augimo faktorius (NGF; Levi-Montalcini and Angeletti, 1968, Phys. Rev. 48:534); Neurotrofinas-3 (NT-3; Hohn et al., 1990, Nature 344:339; Maisonnier et al., 1990, Science 247:1446), smegeninės kilmės neurotrofinis faktorius (BDNF; Barde et al., 1982, EMBOJ 1:549) ir ciliarinis neurotrofinis faktorius (CNTF; Lin et al., 1979, Science 246:1023).

2.2.1. NERVINIO AUDINIO AUGIMO FAKTORIUS

Nervinio audinio augimo faktorius (NGF) dabartiniu metu yra iš visų neurotrofinių molekulių pilniausiai charakterizuotas ir, kaip parodyta *in vitro* ir *in vivo*, yra svarbus simpatinių ir nervinių sensorinių neuronų išgyvenimui, kurie ankstyvajame vystymesi pas viščiuką ir žiurkę yra kilę iš nervinės skiauterės (Levi-Montalcini and Angeletti et al., 1963, Develop. Biol. 7:653-659; Levi-Montalcini et al., 1968, Physiol. Rev. 48:524-569). Nustatyta, kad išvalyto NGF injekcijos į besivystantį viščiuko embrioną apsprendžia išgyvenimo padidėjimą ir spinalinių sensorinių bei simpatinių neuronų hipertrofiją (Levi-Montalcini and Booker, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:373-384; Hamburger et al., 1981, J. Neurosci 1:60-71). Ir priešingai, pašalinimas ar izoliavimas endogeninio NGF po anti-NGF antikūnų injekcijos trukusios parą žiurkių naujagimiams asocijuojasi su negrįžtamais simpatinės nervų sistemos pažeidimais (Levi-Montalcini and Booker, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. 46: 384-391; Levi-Montalcini and Angeletti 1966, Pharmacol. Rev. 18:619-628). Poveikis NGF-antikūnų netgi ankstesnėje vystymosi stadijoje antikūnų injekcijomis *in utero* (į gimdą), ar pasyviu transplacentiniu motininių antikūnų pernešimu, sukelia žmų nervinių sensorinių neuronų skiauterinės kilmės, tokių kaip spinaliniai ir spinomedialiniai trišakiniai sensoriniai neuronai praradimą (Goodert et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1580-1584; Gorin and Johnson, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5382-5386). Iki šiol beveik visi NGF tyrimai buvo skirti jo vaidmeniui periferinėje nervų sistemoje, tačiau dabar atrodo, kad NGF taip pat veikia į centrinės nervų sistemos neuronų populiacijų vystymąsi ir išsaugojimą (Thoenen et al., 1987, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109:134-178; Whittemore and Seiger, 1987, Brain Res. Rev. 12:439-464).

NGF baltymo gausumas pažandinėje liaukoje pas pelę leidžia, naudojant santykinai tradicinę baltymų chemiją, nustatyti jo pagrindinę seką (Angeletti and Bradshaw, 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. 68:2417-2420). NGF genas dabar klonuotas iš daugelio rūšių, įskaitant pelę (Scott et al., 1983, Nature 302:538-540), žmogų (Ulrich et al., 1983, Nature 303:821-825), karvę bei viščiuką (Meier et al., 1986, EMBOJ 5:1489-1493) ir žiurkę (Whittemore et al., 1988, J. Neurosci. Res., 20:402-410), panaudojant pagrinde tradicinę molekulinę biologiją, kuri remiasi baltymine seka pelės NGF su tikslu sudaryti tinkamus oligonukleotidinius zondus. NGF gausumas taip pat palengvina NGF receptoriaus tyrimus, kas galu gale atvedė į molekulinį klonavimą vieno komponento NGF receptoriaus iš žmogaus ir žiurkės (Johnson et al., 1986, Cell 47:545-554; Radeke et al., 1987,

Nature 325:593-597). Šiuo metu gerai nustatyta, kad NGF nėra visur esantis neurotrofinis faktorius. Periferinėje nervų sistemoje NGF nėra išgyvenimo faktorius parasimpatiniams neuronams, nerviniams sensoriniams neuronams plakodinės kilmės ar žarniniams neuronams, kaip nustatyta tyrimuose in vitro ir in vivo. Be to, NGF nėra išgyvenimo faktorius ir besivystantiems motoneuronams (Oppenheim, 1982, J. Comp. Neurol. 210:174-189), nors šitie neuronai ekspresuoja vystymosi metu bent jau žemos formos NGF receptoriaus sritį (Raivich et al., 1985, EMBOJ. 4:637-644). NGF įtakos į šiuos neuronų tipus nebuvimas apsprendė pajiešką kitų neurotrofinių faktorių, ypač tokių faktorių, kurie galėtų palaikyti išgyvenimą spinalinių motoneuronų ir/arba parasimpatinių krumplyninio ganglijaus neuronų.

2.2.2. SMEGENINĖS KILMĖS NEUROTROFINIS FAKTORIUS

Neurotrofinį aktyvumą, galintį palaikyti viščiukų embrionų dorsalinės šaknelės ganglijaus neuronų išgyvenimą in vitro, identifikuoja "kondicionuotoje terpėje", kurioje kultivuojamos žiurkės gliomos ląstelės C-6 (Barde et al., 1978, Nature 274:818). Aktyvumas nesineutralizuoja antikūnais pelės NGF, kas rodo, kad kondicionuotoje terpėje yra kitas neurotrofinis faktorius. Analogiški aktyvumai, kurių negalima blokuoti NGF antikūnais, nuosekliai pateikti suaugusios žiurkės smegenų normalių astrogljinių ląstelių kultūrose (Lindsay, 1979, Nature 282:80-82; Lindsay et al., 1982, Brain Res. 243:329-343), besivystančių bei suaugusių žiurkių smegenų ekstraktuose (Barde et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1199-1203) ir besivystančių bei suaugusių viščiukų nugaros smegenyse (Lindsay and Ivers, 1984, Neurosci. 12:45-51). Tačiau nei vienu atveju nebuvo išskirtas ar identifikuotas aktyvus faktorius(iai), ir išliko klausimas, ar stebėtus aktyvumus sukėlė vienas ir tas pat faktorius ar skirtingi faktoriai.

Panaudojus kiaulės smegenis kaip pradinę medžiagą Barde et al. (1982, EMBOJ 1:549-553) aprašė faktorių, dabar vadinamą smegeninės kilmės neurotrofiniu faktoriumi (BDNF), kuris, matyt, skatina išgyvenimą dorsalinės šaknelės ganglijaus neuronų iš viščiukų embrionų E10/E11. Nustatyta, kad neurotrofinis aktyvumas yra aukštos-bazės baltyme (izoelektrinis taškas, pI 10.1), kuris migruoja elektroforezės metu poliakrilamido gelyje su Natrio dodecilsulfatu (EF-PAAG su Na-DDS) ir pasirodo kaip atskira juosta su molekuline mase 12.3 kDa. Pastebėta, kad aukšta-bazinė prigimtis ir molekulinis dydis BDNF labai artimi monomerui NGF.

Geno BDNF klonavimas pirmą kartą įvykdytas atitinkamai su paraiškos aprašymu patentui JAV Nr. 07/400591, paduotos 1989 metų rugpjūčio 30 d., kuri įvesta į duotą aprašymą kaip nuoroda. Be galo mažus kiekius baltymo BDNF išvalo iš kiaulės smegenų, kas leidžia nustatyti fragmentus aminorūgštinės sekos, kurią savo ruožtu, galima panaudoti konstravimui atitinkamų oligonukleotidų. Šie sintetiniai oligonukleotidai paskui panaudojami kaip praimeriai polimerazės-grandininėje reakcijoje (PCR) su kDNR-matrica, gauta iš BDNF-gaminančių ląstelių. PCR produktus naudoja kaip zondus genų pilnos kDNR ir/arba genomio BDNF klonavimui iš visos eilės rūšių, įskaitant žmogų, kiaulę, žiurkę ir pelę, ir nustato šių genų seką. Rekombinantinio BDNF ekspresija atliekama COS ląstelėse.

Pirmas parodymas, kad BDNF neuroninis specifiskumas skiriasi nuo NGF specifiskumo, buvo atliktas in vitro, ir kalbėta, kad išvalytas BDNF palaiko išgyvenimą 40-50% sensorinių neuronų, disocijuotų iš viščiuko embriono nervinio mazgo plakodinės kilmės į E6, E9 ar E12 (Lindsay et al., 1985, J. Cell. Sci. Supp. 3:115-129). NGF nerodė pastebimo poveikio į šiuos neuronus nei pats, nei kartu su BDNF. Vėlesniuose tyrimuose su eksplantato kultūra buvo parodyta, kad BDNF palaiko išgyvenimą ir neuritinę išaugą iš kitų plakodinės kilmės nervinių ganglijų, įskaitant liežuvinio ryklės nervo apatinį ganglijų, kelinį ganglijų ir trišakio nervo ganglijų (Davies et al., 1986, J. Neurosci. 6:1897-1904), ir nei vienas iš jų nebuvo jautrus NGF. Visuose aukščiau aprašytuose tyrimuose neutralizuojantys NGF antikūnai neturėjo jokio poveikio į BDNF aktyvumą. Be jo poveikio į kultivuo-

tus neuronus iš periferinio ganglijaus, BDNF, kaip nustatyta, stimuliuoja išgyvenimą ir neuroninę diferenciaciją ląstelių, kultyvuotų iš paprastos putpelės nervinės skiauterės (Kalchelm and Gendreau, 1988, *Develop. Brain Res.* 41:79-86).

Du paskutiniai BDNF tyrimai (Kalchelm et al., 1987, *EMBOJ* 6:2871-2873; Hofer, Barde, 1988, *Nature* 331:261-262) parodė fiziologinį BDNF vaidmenį paukščio periferinės nervų sistemos vystymesi. Jei sudaryti mechaninį barjerą in ovo pas E3/E4 (3 ar 4 embrioninė diena) tarp besivystančio dorsalinės šaknelės mazgo (DRG) ir taikinio centrinės nervų sistemos nerviniame vamzdyje, tai daugelis DRG neuronų išmirs (Kalchelm and Le Dourarin, 1986, *Develop. Biol.* 116:451-456). Padaryta išvada, kad ši neuronų mirtis gali būti apspręsta centrinės nervų sistemos (nervinio vamzdelio), nešančios neurotrofinių faktorių, deprivacijos. Po to buvo pastebėta, kad BDNF, prijungtas prie lamininu padengtos sialastinės membranos, gali trukdyti ląstelių žūtį (Kalchelm et al., 1987, *EMBOJ* 6:2871-2873). Nustatyta, kad BDNF injekcijos į paprastos putpelės besivystančius kiaušinius sumažina ganglijaus ląstelių natūralią mirtį, kas nestebima NGF atžvilgiu (Hofer and Barde, 1988, *Nature* 331:261-262). Be poveikio į periferinius sensorinius neuronus, kurie kilę kaip iš nervinės skiauterės, taip ir iš nervinės plakodės, BDNF palaiko centrinės nervų sistemos besivystančių neuronų išgyvenimą. Johnson et al., (1986, *J. Neurosci.*, 6:3031-3038) pateikė duomenis, rodančius, kad BDNF palaiko išgyvenimą tinklainės ganglijinių ląstelių, kultyvuotų iš žiurkės embrionų E17. Šie pranešimai išplėtė tyrimus, kurie parodė, kad terpės kondicionavimas ir smegenų ekstraktai, gauti iš tinklainės ganglijinių ląstelių taikinių sričių, palaiko šių neuronų išgyvenimą (McCaffery et al., 1982, *Exp. Brain Res.* 48:370-386; Sarthy et al., 1983, *J. Neurosci.* 3:2532-2544; Turner et al., 1983, *Dev. Brain Res.* 6:77-83).

Be poveikio į kultūroje besivystančių neuronų išgyvenimą, BDNF turi poveikį į suaugusios periferinės ir centrinės nervų sistemos kultyvuotus neuronus. BDNF, o taip pat ir NGF, stimuliuoja aksoninę regeneraciją iš suaugusios žiurkės DRG neuronų kultūroje (Lindsey, 1988, *J. Neurosci.*, 8:2394-2405), nors suaugusiems sensoriniams neuronams, matyt, nereikia neurotrofinių faktorių išgyvenimui in vitro laike 3 ar 4 savaitių. Be to, suaugusios žiurkės tinklainės kultūrose BDNF skatina kaip išgyvenimą, taip ir aksoninę elongaciją iš tinklainės ganglijinių ląstelių (Thanos et al., 1989, *Eur. J. Neurosci.*, 1:19-26). Be to, parodyta, kad BDNF ilgina ląstelių išgyvenimą vidurinių smegenų ventralinėse kultūrose, kaip išmatuota pagal ląstelių kiekį, kurios yra teigiamos tirozinhidroksilazei, vizualiai stebėtų su pagalba imunocitochemijos. Be to BDNF padidina išgyvenimą cholinerginių neuronų disocijuotoje ląstelių kultūroje, gautoje iš žiurkės septalinės srities (paraiška patentui JAV Nr. 07/400591, paduota 1989 metų rugpjūčio 30 d.). NGF ir BDNF biologinio poveikio palyginimas pateiktas 1 Lentelėje.

LENTELĖ 1

BDNF ir NGF* biologinio aktyvumo palyginimas

Periferinė nervų sistema		Išgyvenimas	
Ganglijai:		BDNF	NGF**
(I)	Viščiuko E6 DRG	-	++
	Viščiuko E10 DRG	+	++
	Viščiuko E12 Simpatinis	-	++
	(Barde et al., 1980, aukščiau)		
(II)	Viščiuko E6-E12 DRG	++	++
	Viščiuko E6-E12 Mazginis	++	-
	Viščiuko E12 Simpatinis	-	++

Viščiuko E12 Krumplyninis (Lindsay et al., 1985, aukščiau)	-	-
(III) Viščiuko E3-E14:		
Tuščiasis (gnl. jugulare)	+ / + +	++
DM-triškakis	+ / + +	++
Uolinis	+ / + +	-
Kelinis	+ / + +	-
Vestibulinis	-	-
VL-triškakis	++	-
Vidurinių smegenų triškakis (Davies et al., 1986, aukščiau) (Barde et al., 1987, Prog. Brain Res., 71:185-189)	++	-
Centrinė nervų sistema		
(I) Žiurkės E17 tinklainės ganglijinės ląstelės (Johnson et al., 1986, J. Neurosci., 6:3031-3038)	++	-
(II) Vidurinių smegenų ventraliniai dopaminerginiai neuronai	++	-
(III) Priekinių smegenų bazaliniai cholinerginiai neuronai (paraiška patentui JAV Nr. 07/400591, paduota 1989 metų rugpjūčio 30 d.)	++	++

* Chronologine tvarka atitinkamai publikacijos datai;
efektai tirti in vitro

** Nėra išgyvenimo: (-); silpnas išgyvenimas (+);
geras išgyvenimas (++)

Subrendusio BDNF prognozuojamos pirminės struktūros analizė parodė jo ypatingą tapatumą su NGF; tiksliai su trimis tarpais, įvestais į NGF seką kartiravimo optimizacijai, 51 tapatumas yra bendras įvairiems NGF (nuo gyvatės iki žmogaus) ir BDNF. Svarbu, kad į šiuos tapatumus įeina šešios cisteino liekanos.

2.2.3. NEUROTROFINAS-3

Pastebėtas atitikimas tarp NGF ir BDNF kelia prielaidą, kad abu šie faktoriai gali būti stambesnės artimai surištų neurotrofinių molekulių šeimos nariais. Kai homologines sritis panaudojo, kad sukonstruoti oligonukleotidinius pramerius, naudojamus polimerazės-grandininėje reakcijoje, siekiant identifikuoti naujus narius genų BDNF/NGF šeimos, aptiktas naujas šeimos narys, pavadintas neurotrofinu-3, ir genas NT-3 klonuojamas iš pelės, žiurkės ir žmogaus (žiūrėti paraišką patentui JAV Nr. 07/490004, paduotą 1990 metų kovo 7 d. ir įvestą į šį aprašymą kaip nuoroda). Pilna struktūra subrendusios pelės baltymo NT-3, sudaryta iš 119 aminorūgščių su išskaičiuotu pI apie 9.5, atspindi tai, kas nustatyta NGF ir BDNF; pasirodo kad numanoma signalinė seka 18 aminorūgščių (parodanti 5 ir 9 aminorūgštinius identiškumus BDNF ir NGF, atitinkamai) tesiasi proseka iš 121 aminorūgšties (lyginant su proseka iš 103 aminorūgščių pelės NGF ir proseka iš 112 aminorūgščių pelės BDNF). Palyginimas subrendusių pelės NGF, BDNF ir NT-3 išryškina 54 aminorūgštinius identiškumus (1 Pav.) Visos 6 cisteino liekanos, kurios NGF ir BDNF įtrauktos į disulfidinių tiltelių susidarymą (Leibrock et al., 1989, Nature 341:149-152; Angletti, 1973, Biochem. 12:100-115), yra tarp išlikusių liekanų. Analogiškai, subrendęs žiurkės NT-3 dalinasi 57% aminorūgštinės homologijos su žiurkiniu NGF ir 58% aminorūgštinės homologijos su žiurkiniu BDNF; 57 iš 120 liekanų (48%) dalinasi tarp visų trijų baltymų (1D Pav.). Ir vėl šešios cisteino liekanos žiurkinių NGF ir BDNF pilnai išlieka žiurkiniame NT-3, o didžiausios homologijos tarp trijų baltymų sritys

susigrupavusios aplink šias cisteino liekanas. Be homologijos tarp NT-3, NGF ir BDNF tose rūšyse stebima aukšto lygio konservacija nukleorūgštinės sekos tarp žiurkinio ir žmoginio NT-3 srityje, kuri koduoja subrendusį polipeptidą (119 aminorūgščių). Žmogaus ir žiurkės genai maždaug 92% turi homologiją DNR-sekoje. Tačiau, nei vienas skirtumas nukleotidų sekos tarp žmogaus ir žiurkės šioje srityje neduoda aminorūgštinio pakeitimo; išskirta aminorūgštinė seka subrendusios žiurkės ir žmogaus (o taip pat ir pelės NT-3) yra absoliučiai identiška, primenanti apie aukšto lygio konservaciją BDNF, kas rodo pilną identiškumą aminorūgštinės sekos subrendusio polipeptido tarp žiurkės, pelės, žmogaus ir kiaulės. Priešingai, aminorūgštinė seka subrendusio žmogaus NGF ir graužikų (pelės ir žiurkės) NGF skiriasi maždaug 10%.

NT-3 neurotrofinio aktyvumo tyrimai rodo, kad NT-3 sugeba skatinti išgyvenimą ir neuritinę išaugą disocijuotų neuronų dorsalinės šaknelės ganglijaus kultūroje. Be to, NT-3 skatina neuritinę išaugą iš eksplantatų kaip mazginio ganglijaus, taip ir simpatinio ganglijaus, tada kai BDNF skatina išaugą iš mazginio ganglijaus, bet ne simpatinio ganglijaus, o NGF skatina išaugą iš simpatinio ganglijaus, bet ne iš mazginio ganglijaus. Todėl NT-3 turi platesnį veikimo specifiškumą, negu BDNF ar NGF.

NT-3 gali būti svarbus nervų sistemos vystymosi faktorius. Lyginant santykinį kiekį transkriptų NGF, BDNF ir NT-3 smegenyse naujagimių ir suaugusių pelių nustatyta, kad NT-3 buvimo lygis naujagimių smegenyse yra aukštesnis nei suaugusiose smegenyse. RNR NT-3 lygiai centrinėje nervų sistemoje yra žymiai aukštesni per fetalinį vystymąsi ir ryškiai sumažėja suaugusiems.

2.2.4. CILIARINIS NEUROTROFINIS FAKTORIUS

Ciliariniai neurotrofiniai faktoriai (CNTF) tai - baltymai, kurie specifiškai skatina gemalinių viščiukų krumplyninio (ciliarinio) ganglijaus neuronų išgyvenimą *in vitro* (Banthorpe et al., 1960, J. Neurochem. 34:69-75). Krumplyninis ganglijus anatomiškai išdėstytas akiduobėje, tarp tiesiojo raumens ir regimojo nervo; jis gauna parasimpatinio nervo skaidulas iš akies motorinio nervo, kuris inervuoja krumplyninį raumenį ir vyzdžio sfinkterį. Nustatyta, kad neuronai krumplyninio mazgo tarp neuroninių populiacijų turi tam tikrus ląstelių mirties periodus. Viščiuko krumplyninio ganglijaus pusė neuronų, esančių 8 embrioninę dieną (E8), miršta prieš E14 (Landmesser and Pilar, 1974, J. Physiol. 241:737-749). Per tą patį laiko tarpą neuronai krumplyninio ganglijaus sudaro junginius su jų audiniais-taikiniais, o būtent, su krumplyno kūnu ir akies gyslaine. Landmesser and Pilar (1974, J. Physiol. 241:751-756) nustatė, kad akies pašalinimas anksčiau ląstelių mirties periodo sukels pilną krumplyninio ganglijaus neuronų netekimą ipsilateralinėje pusėje. Narayanan and Narayanan (1978, J. Embryol. Ex. Morphol. 44:53-70) nustatė, kad, implantuojant papildomą akies užuomazgą ir tuo pačiu padidinant kiekį tinkamo audinio-taikinio, galima sumažinti krumplyninio ganglijaus neuronų mirtį. Šie rezultatai palaiko neurotrofinio faktoriaus, kuris veikia krumplyninio ganglijaus neuronus, egzistavimo galimybę.

Kaip nustatyta, kultūroje krumplyninio ganglijaus neuronams (CG), kad išgyventų reikalingas faktorius(iai). Ciliarinio neurotrofinio faktoriaus(ių) aktyvumas (CNTF) identifikuotas kondicionuotose terpėse: vištų raumenų ląstelių (Helfand et al., 1976, Dev. Mol. 50:541-547; Helfand et al., 1978, Exp. Cell Res. 113:39-45; Bennett and Nurcombe, 1979, Brain Res. 173:543-548; Nishi and Berg, 1979, Nature 277:232-234; Varon et al., 1979, Brain Res. 173:29-45), raumenų ekstraktų (McLennan and Hendry, 1978, Neurosci. Lett. 10:269-273; Bonahandy et al., 1980, Neurosci. Lett. 18:197-201), vištų gemalų ekstrakto (Varon et al., 1979, Brain Res. 183:161-180) ir terpėje, kondicionuotoje širdies ląstelėmis (žiūr. pavyzdžiui, Adler et al., 1979, Science 204:1434-1436 and Barbin et al., 1984, J. Neurochem. 43: 1468-1478). CNTF išvalytas ir išskirtas iš žiurkės sėdimosio nervo, ir aminorūgštinė seka įvairių fragmentų nustatyta dujų-faziniu mikrosekvenavimo būdu; gautą aminorūgštinę seką naudoja žiurkės geno CNTF klonavimui, panaudojant klonavimo metodikas su

polimerazės-grandininė reakcija (paraiška patentui JAV Nr. 07/408172, paduota 1989 m. rugsėjo 15 d., ir paraiška patentui JAV Nr. 07/429517, paduota 1989 m. spalio 31 d., kurios įvestos į duotą aprašą kaip nuorodos). Po to žiurkės CNTF zoną naudoja žmogaus CNTF geno klonavimui. Palyginimas nukleorūgštinių sekų žmogaus ir žiurkės CNTF rodo, kad žmogaus genas turi vienintelį introną toje pat padėtyje, kaip ir žiurkės genas CNTF. Žmogaus introno sekos, matyt, turi žymius nukrypimus nuo žiurkinių, nors tai neatitinka koduojančios srities žymios konservacijos vaizdo.

Remiantis nukleotidine seka galima prognozuoti, kad CNTF turi molekulinę masę apie 22.8 kDa (išskaičiuota dydžiui maždaug 200 aminorūgščių), kas atitinka molekulinei masei, įvertinus natūralios kilmės CNTF su pagalba poliakrilamidinės gelio-elektroforezės analizės (22.5 kDa; Saadat et al., 1989, J. Cell Biol. 108:1807-1816). Tokiu būdu, CNTF aminorūgštinė seka išreiškia požymius citozolinio baltymo, tai yra, nei vieno signalinio peptido, nei vienos konsensualios-sekos glikolizei nėra ir yra tikrai viena cisteino liekana padėtyje 17. Jokios sekų homologijos nepastebėta tarp CNTF ir NGF, BDNF ar fibroblastų augimo faktoriaus (FSF) ir purpurino, kiekvienas iš kurių asocijuojasi su aktyvumais skirtais išgyvenimui, analogišku tiems, kurie yra CNTF (Unsicker et al., 1987, Proc. Natl. Sci. USA, 84: 5459-5463; Schubert et al., 1986, J. Cell Biol. 102:2295-2301). CNTF būdinga eilė biologinių efektų. Iš pradžių CNTF buvo aprašytas kaip palaikantis viščiuko E8 krumplyninio ganglijaus (parasimpatinės nervų sistemos komponento) neuronų išgyvenimą. Saadat et al., (1989, J. Cell Biol. 108:1807-1816) pastebėjo, kad labiausiai išvalytas preparatas CNTF žiurkės sėdimosio nervo indukuoja cholinerginę diferenciaciją žiurkės simpatinių neuronų kultūroje. Be to, Hoffman (1988, J. Neurochem. 51:109-113) nustatė, kad vištos akies CNTF aktyvumas, padidina lygį cholin-O-acetiltransferazinio aktyvumo tinklainių monosluoksnių kultūrose. Hughes et al., (1988, Nature 335:70-75) tyrė prenatalinių žiurkių regimojo nervo ir smegenų bipotencialinių ląstelių-pirmtakų populiaciją; manoma, kad ši ląstelių populiacija duoda pradžią tiek oligodendrocitams, tiek ir antro tipo astroцитams. Tyrimai rodo, kad oligodendrocitų diferenciacija vyksta iš ląstelės-pirmtako oligodendrocito-tipo 2-astrocitas (0-2A), nesant bet kurio konkretaus augimo faktoriaus, tada kai antro tipo astroцитų diferenciacijai reikia specifinio indukuoto baltymo. Hughes et al., pastebėjo, kad baltymas, indukuojantis antro tipo astroцитus analogiškas ar identiškas CNTF (žiūr. taip pat Anderson, 1989, Trends Neurosci. 12:83-85). Be to parodyta, kad rekombinantinis CNTF skatina išgyvenimą mediodorsalinių neuronų nugaros smegenų kultūroje, o CNTF sėdimosio žiurkės nervo išvalytoje formoje, apsaugo motoneuronus nuo indukuotos mirties pažeisto naujagimės žiurkės snukio nervo (n. facialis) (paraiška patentui JAV Nr. 07/429517, paduota 1989 m., spalio 31 d., kuri įvesta į duotą aprašą kaip nuoroda).

2 Lentelėje pateikti aktyvumai, asocijuoti su NGF, BDNF, NT-3 ir CNTF; matyt, yra ir papildomi aktyvumai, nors kol kas ir nenustatyti.

2 LENTELĖ

Ląstelės, atsakingos už neurotrofinius faktorius

I. Ląstelės, atsakingos už NGF

A. Simpatiniai neuronai

B. Nerviniai sensoriniai neuronai skiauterinės kilmės

C. Dorsalinės šaknelės ganglijai E6-E12

D. Priekinių smegenų bazaliniai cholinerginiai neuronai

II. Ląstelės, atsakingos už BDNF

A. Sensoriniai neuronai, kilę iš nervinės skiauterės

(I) dorsalinės šaknelės ganglijai (E10/E11)

- (II) tuščiasis ganglijus (gnl. jugulare)
- (III) trišakio nervo dorsomedialinis ganglijus (DM)
- (IV) vidurinių smegenų trišakio nervo branduolys
- B. Sensoriniai neuronai, kilę iš ektoderminės plakodės (I) mazginis ganglijus (gnl. nodosum)
 - (II) vestibulinis ganglijus
 - (III) uolinis ganglijus
 - (IV) kelinis ganglijus
- (V) trišakio nervo ventrolateralinis ganglijus
- C. Tinklainės ganglijus
- D. Vidurinių smegenų dofaminerginiai neuronai
- E. Priekinių smegenų bazaliniai cholinerginiai neuronai III. Ląstelės, atsakingos už NT-3
- A. Dorsalinės šaknelės ganglijus (DRG)
- B. Simpatinis ganglijus
- C. Mazginis ganglijus
- IV. Ląstelės, atsakingos už CNTF
- A. Krumplyninis ganglijus E8 (gnl. ciliare)
- B. Simpatiniai cholinerginiai neuronai
- C. Astroцитai 2 tipo
- D. Nugaros smegenų mediodorsaliniai neuronai
- E. Motoneuronai (pavyzdžiui, veido nervo motoneuronai)
- F. Neuronai DRG E10

Šis išradimas priklauso chimeriniams neurotrofiniams faktoriams, kurie neša savyje bent dalį gamtinės kilmės ląstelinio faktoriaus ir dalį bent jau vienos kokios tai kitos molekulės, taip kad gauta chimerinė molekulė įgauna neurotrofinį aktyvumą. Išradimas, dalinai remiasi išradimu to, kad chimerinės molekulės, turinčios dalis NGF ir BDNF, tikriausiai, turi neurotrofinį aktyvumą ir atskirais atvejais išreiškia platesnį aktyvumo spektrą, negu spektras bet kurios giminingos molekulės. Išradimas, be to, remiasi išradimu to, kad chimerinės molekulės, įjungiančios neurotrofinio faktoriaus sekas, o taip pat papildomas peptidines sekas, gali išlaikyti neurotrofinį aktyvumą ir kai kuriais atvejais netgi gali turėti stipresnį aktyvumą nei tėvinis faktorius. Šitas išradimas pareiškia nukleini- nes rūgštis, koduojančias chimerinius neurotrofinius faktorius, šių chimerinių neurotrofinių faktorių ekspresijos būdams, baltymams chimerinių neurotrofinių faktorių ir peptidinių fragmentų bei jų darinių, antikūnams, nukreiptiems prieš chimerinius neurotrofinius faktorius, siekiant nustatyti specifiskumo determinantus, ir metodams diagnostikos bei neurologinių sutrikimų gydymo, į kuriuos įeina pateikiamo išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai. Šitas išradimas taip pat pateikia eilę konkrečių rekombinantinių plazmidžių, koduojančių biologškai aktyvius neurotrofinus.

Chimeriniai neurotrofiniai faktoriai atitinkamai išradimui turi eilę privalumų prieš neurotrofinius faktorius gamtinės kilmės. Chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali, pavyzdžiui, turėti aktyvumą dviejų neurotrofinių faktorių vienoje molekulėje arba gali tarnauti kaip endogeninio neurotrofinio faktoriaus superagonistai, tuo pačiu užtikrindami padidinto biologinio atsako gavimą prie žemesnių dozių. Be to, chimeriniai neurotrofiniai faktoriai atitinkamai šiam išradimui gali būti naudingi nu- taikant aktyvų junginį į ląsteles, atsakingas už neurotrofinį faktorių. Be to, konstrukcija chimerinių neurotrofinių faktorių, kurie išlaiko specifinį biologinį aktyvumą, tačiau yra nutaikyti į faktoriaus pogrupę - atsakingas ląsteles, gali užtikrinti neurologinių sutrikimų gydymą, tačiau pašalinti apribo- jimus plačiai išplitusio tėvinių molekulių(ės) aktyvumo.

4. BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

1 Pav. pateiktas schematinis strategijos vaizdas, naudojamos konstruojant chimeras BDNF-NGF, panaudojus tris oligonukleotidinius praimerius ir vienlaiptę polimerazės grandininę reakciją. Praimerius konstruoja taip, kad reakcijos produktas galėtų įjungti restrikcinių fermentų NarI ir NotI skilimo saitus, kurie palengvintų produkto inserciją po sekvenavimo prepro-srities BDNF į ekspresuojančią plazmidę pC8hB(PI). Užbrūkšniuoti ploteliai žymi NGF seką, o atviri ploteliai žymi BDNF seką.

2 Pav. pateiktas schematinis strategijos vaizdas, naudojamos konstruojant chimeras BDNF-NGF, panaudojus keturis oligonukleotidinius praimerius trilaiptėje polimerazės grandininėje reakcijoje. Užbrūkšniuoti ploteliai žymi NGF seką, ištisiniai ploteliai žymi vektorinę seką ir atviri ploteliai žymi BDNF seką.

3 Pav. pateiktas schematinis strategijos vaizdas, naudojamos konstruojant neurotrofinių faktorių myc-žymėtas chimeras.

A. Konstravimas myc-žymėto NGF; myc-seka užbrūkšniuota, o atviri ploteliai žymi NGF seką.

B. Konstravimas myc-žymėto BDNF; myc-seka užbrūkšniuota, o atviri ploteliai žymi BDNF seką.

4 Pav. 50 mkl ^{35}S -žymėto COS-ląstelinio supernatanto peptizuoja 15% elektroforeze poliakrilamido gelyje su natrio dodecilsulfatu (EF-PAAG su Na-DDS), ir žymėtus baltymus elektroforetiškai perneša ant neiloninės membranos. Membraną eksponuoja juostelėje per naktį, ir gautą autoradiogramą fotografuoja. Takelis 1, COS MOCK; Takelis 2, žmogaus BDNF; Takelis 3, mBDNF/3' myc (BM1); Takelis 4, pelės NGF; Takelis 5, mNGF/3' myc (NM1). Molekulinės masės standartai pateikti.

5 Pav. pateikta chimerinių neurotrofinių faktorių nuo R1 iki R10, BM1 ir NM1 išvesta amino-rūgštinė seka.

6 Pav. pateikti rezultatai kolorimetrinės analizės MTT dorsalinės šaknelės ganglijaus (DRG) arba simpatinio ganglijaus (SG), paveiktų su pagalba (A) BDNF, (B) NGF arba (C) BM1, myc-žymėtu BDNF. Spektrinis absorbcijos sugebėjimas prie 570-650 nm atidėtas priklausomai nuo didėjančio praskiedimo COS ląstelių supernatanto, turinčio neurotrofinį aktyvumą.

7 Pav. pateiktas schematinis strategijos vaizdas, naudojamos konstruojant chimeras NGF-BDNF, panaudojus keturis oligonukleotidinius praimerius trilaiptėje polimerazės grandininėje reakcijoje. Praimeris A tai yra praimeris T7, praimeriai B ir C skiriasi tarp dvylikos chimelių ir pateikti 10 Lentelėje, o praimeris D tai yra praimeris T3. Užbrūkšniuoti ploteliai žymi vektorinę seką, atviri ploteliai žymi preproseką, ploteliai su taškiniu punktyru reiškia seką subrendusio NGF, o ištisiniai ploteliai žymi BDNF seką.

8 Pav. A. Modifikuotas vektorius PBJ-5, naudojamas chimerinių neurotrofinių faktorių NGF-BDNF ekspresijai. Vektorius turi geną, suteikiantį stabilumą atžvilgiu ampicilino (ištisinė strėlė), pBR322-pradžią replikacijos (atvira strėlė), promotorius SR (punktyrinė strėlė; Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8:466-472) ir klonuojantis saitas (užbrūkšniuotas plotelis), turintis splaisingo ribą, saitą poli-A ir restrikcinės endonukleazės skaldymo saitus Not I, Sac II ir Eco R1.

B. Rezultatai metabolinio žymėjimo COS ląstelių, transfekuotų laukinio tipo NGF, vektoriaus (kontrolinio) ir chimelių NGF-BDNF S1-S12. 40 mkl COS ląstelių supernatanto pakrauna tiesiogiai ir elektroforezuoja su 12.5% EF-PAAG su Na-DDS.

C. EF-PAAG su Na-DDS atžvilgiu metaboliškai žymėtų

baltymų ląstelių COS supernatantuose, transfekuotų NGF laukinio tipo, vektoriaus (kontrolinio) ir chimelių NGF-BDNF S1-S12, imunoprecipituotų su anti-NGF antikūnu. Imunoprecipitaciją vykdo su 400 mkl supernatanto. Elektroforezę atlieka su 12.5% poliakrilamidiniu geliu su natrio dodecilsulfatu.

9 Pav. pateikta diagrama chimery S1-S12, kurioje atviri ploteliai žymi seką NGF ir ištisiniai ploteliai žymi seką BDNF. A) Viršutinė plokštė: Palyginimas aminorūgštinės sekos tarp molekulių NGF, išskirtų iš įvairių rūšių. B) Apatinė plokštė: Palyginimas aminorūgštinės sekos tarp sekų NGF ir BDNF. Aukšti stulpeliai: Duotoje padėtyje priimtos aukšto-kintamumo rūgštys. Žemi stulpeliai: Duotoje padėtyje priimti tik konservatyvūs aminorūgštiniai pakeitimai. Nėra stulpelių: Aminorūgštys duotoje padėtyje išlieka ribose kiekvieno žinomo NGF ir BDNF.

10 Pav. pateikta išvesta chimerinių neurotrofinių faktorių S1-S12 aminorūgštinė seka.

11 Pav. pateikta aminorūgštinė seka NGF, BDNF ir NT-3. Strėlės rodo į cisteino liekanas. Kintančios sritys V1-V4 pažymėtos iš viršaus.

5. SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Išradimo geresniam supratimui (neapsiribojama pateikta medžiaga) smulkus pateikiamo išradimo aprašymas padalintas į tokius padalinius: (I) išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai; (II) chimerinių neurotrofinių faktorių konstravimas; (III) chimerinių neurotrofinių faktorių ekspresija; (IV) neurotrofinių faktorių analizė, kad nustatyti jų aktyvumą ir neuroninį specifiskumą; (V) antikūnai, nutaikyti į chimerinius neurotrofinius faktorius; (VI) pareiškiamo išradimo naudingumas.

5.1. IŠRADIMO CHIMERINIAI NEUROTROFINIAI FAKTORIAI Pateiktas išradimas pareiškia chimerinius neurotrofinius faktorius, kurie (I) įjungia bent dalį ląstelinio faktoriaus, o taip pat dalį bent jau vieno kitokio baltymo, ir (II) turi neurotrofinį aktyvumą. Chimeriniai neurotrofiniai faktoriai pareiškiamo išradimo gali įjungti ląstelinius faktorius arba jų dalis, kurie patys savaime gali arba negali turėti neurotrofinį aktyvumą, kaip pavyzdžiui, nervų augimo faktorius, smegeninės kilmės augimo faktorius, neurotrofinas-3, ciliarinis neurotrofinis faktorius, fibroblastų augimo faktorius (rūgštinis ar bazinis, o taip pat giminingų šeimų nariai), epidermio augimo faktorius, auglinis augimo faktorius beta, auglinis augimo faktorius alfa, interleukinas 1, interleukinas 2, alfa-interferonas, beta-interferonas, gamainterferonas, augimo hormonas, vazoaktyvus žarninis peptidas, vazopresinas ir insulinas.

Chimerinės molekulės šio išradimo įjungia bent jau dalį ląstelinio faktoriaus, o taip pat dalį bent jau vieno kitokio peptido ar baltymo, kur nurodytas baltymas gali arba negali kilti iš junginio, kuris turi neurotrofinį aktyvumą. Šitas peptidas ar baltymas gali įjungti, pavyzdžiui, pilnai ar dalinai, neurotrofinį faktorių, ląstelinį faktorių, toksiną, fermentą, imunoglobuliną ar kitą peptidinę seką, kuri gali ar negali būti asocijuota su funkciniu aktyvumu ir gali arba negali būti antigenine.

Pavyzdžiui, šitas išradimas siūlo tokias chimerines molekules, kurios turi neurotrofinį aktyvumą, kaip išdėstyta 5.4 Skyriuje, žemiau: (I) chimerinę molekulę, kuri įjungia du pilnus neurotrofinius faktorius; (II) chimerinę molekulę, kuri įjungia vieną pilną neurotrofinį faktorių, surištą su vienu pilnu ne-neurotrofiniu ląstelinio faktoriu; (III) chimerinę molekulę, kuri įjungia dalis dviejų neurotrofinių faktorių; (IV) chimerinę molekulę, kuri turi dalį neurotrofinio faktoriaus, o taip pat dalį ne-neurotrofinio ląstelinio faktoriaus; (V) chimerinę molekulę, kuri įjungia bent jau dalį neurotrofinio faktoriaus ir peptidinę seką, kuri gali arba negali būti antigenine; (VI) chimerinę molekulę, kuri įjungia bent jau dalis dviejų neurotrofinių faktorių, o taip pat peptidinę seką, kuri gali arba negali būti antigenine.

Šio išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali būti taip pat surišti su peptidiniais junginiais. Pavyzdžiui, pageidautina prijungti angliavandenį, lipidinę dalį ar kitą organinį junginį prie chimerinio neurotrofinio faktoriaus. Tokie junginiai galėtų įjungti toksinius agentus, agentus trukdančius daugintis, aukšto-imunogeniškumo agentus, angiogeninius agentus, anti-angiogeninius agentus, koagulantus, anti-koagulantus, fluorescuojančius junginius, radioaktyvius junginius ir taip toliau.

Kai jungiamos dalys neurotrofinio faktoriaus ar kito ląstelinio faktoriaus su dalimis neurotrofinio arba kito ląstelinio faktoriaus, pageidautina sudaryti chimerinę molekulę taip, kad dalis vieno fak-

toriaus bûtų delecijuota, o paskui pakeista dalimi kito faktoriaus, kas užtikrintų palaikymą artimo dydžio vieno iš tėvinių faktorių reikiamame lygyje, nors išradimas neapsiriboja tokiu variantu. Be to, jeigu du faktoriai įjungia homologines sritis, pageidautina, kad homologinės sritys bûtų tarpusavy pakeičiamos, kas užtikrintų sukūrimą chimerinės molekulės, kuri bûtų homologinė (bet skirtinga) atžvilgiu abiejų tėvinių faktorių. Papildomame variante(tuose) faktoriaus sritis, kuri, kaip manoma, turi minimalią funkciją, gali būti pakeista sritimi kito faktoriaus ar kito peptido, kuri yra biologiškai aktyvi; tokios chimeros gali turėti padidintą tėvinių faktorių biologinį aktyvumą. Alternatyviai, faktoriaus sritis, kuri asocijuojasi su nepageidautinu biologiniu aktyvumu, gali būti pakeista dalimi kito faktoriaus arba kito peptido, taip, kad nepageidautiną aktyvumą galima bûtų sumažinti arba pašalinti; tokie variantai gali būti naudingi, sudarant chimerinius neurotrofinius faktorius su minimaliais nepageidautiniais pašaliniais efektais ar toksiškumu.

Alternatyviai, pareikšto išradimo chimerinės molekulės gali koduotis nukleininų rūgščių seka, kur seka, koduojanti ląstelinį faktorių, pertraukiama sekos, koduojančios peptidą ar baltymą, taip kad chimerinis neurotrofinis faktorius, koduojamas tokios molekulės, charakterizuojamas faktoriaus baltymo insercija. Papildomai šis išradimas siūlo amino-galines, o taip pat karboksilo-galines jungtis tarp, bent jau faktoriaus dalies ir kito peptido.

Kai kuriais atvejais, kai homologinės dalys dviejų faktorių sukeistos, chimerinė molekulė gali efektyviai skirtis nuo vieno iš jos tėvinių junginių vienintele aminorūgštimi; tokie chimeriniai neurotrofiniai faktoriai pareiškami šitame išradime ir pateikiamos pavyzdžiais chimeros S-6 ir S-11, kurios aptariamose 8 Skyriuje.

Pageidautinuose variantuose šitame išradime chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gaunami pakeičiant atitinkamas dalis giminingų neurotrofinių faktorių. Ypač pageidautini variantai šito išradimo kai molekulės chimerinių neurotrofinių faktorių įjungia dalis dviejų ar daugiau narių identifikuotos šeimos "neurotrofinų", tame tarpe NGF, BDNF, NT-3 ir kitų. Atitinkamai varianto specifiškumui dalis neurotrofinų šeimos narių galima išdėstyti taip, kad išlaikyti antrinę ir/arba tretinę molekulės struktūrą. Papildomuose išradimo variantuose inserciją neurotrofinės šeimos peptidinių sekų ar pakeitimą dalies, koduojančios neurotrofinės šeimos seką, peptidine seka neneurotrofinės šeimos galima įvykdyti taip, kad išliktų antrinė ir/arba tretinė struktūra ir konformacija, asocijuota su neurotrofinų šeimos nariais. Panaudota frazė "antrinė ir/arba tretinė struktūra ir konformacija, asocijuota su neurotrofinų šeimos nariais" gali būti skirta sekai, struktūriniais ir cheminiais požymiais, būdingiems neurotrofinų šeimos nariams, būtent, ilgiui apie 120 aminorūgštinių liekanų, pI maždaug tarp 9 ir 10, ir 6 cisteino liekanoms, išdėstytoms maždaug (tarp penkių aminorūgščių) prie aminorūgščių 14, 57, 67, 79, 108 ir 110, arba analogiškose pozicijose su nuoroda į inserciją ar deleciją homologinėje sekoje, būdingą neurotrofinų šeimos nariams; pavyzdžiui, žuvies NGF seka neša inserciją iš 22 porų pagrindų suaugusios aminorūgšties 65, kuri, manoma, turi kılpa kad, paliktą struktūrą likusiai molekulės daliai konformacijoje, analogiška konformacijai žinduolio NGF. Šio išradimo ypač pageidautinuose variantuose chimeriniai neurotrofiniai faktoriai, įjungiantys bent jau vieną narį neurotrofinų šeimos, turi bent keturias cisteino liekanas maždaug anksčiau nurodytose padėtyse. Labiau pageidautinuose variantuose šio išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai įjungia bent penkias cisteino liekanas maždaug aukščiau nurodytose padėtyse. Labiausiai pageidautinuose variantuose šis išradimas siūlo chimerines molekules, įjungiančias šešias cisteino liekanas maždaug aukščiau nurodytose padėtyse. Papildomuose pageidautinuose variantuose šio išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai įjungia bent keturias cisteino liekanas maždaug aukščiau nurodytose padėtyse ir turi pI maždaug tarp 9 ir 10. Labiau pageidautinuose variantuose chimeriniai neurotrofiniai faktoriai įjungia bent penkias cisteino liekanas maždaug aukščiau nurodytose padėtyse ir turi pI maždaug tarp 9 ir 10. Labiausiai pageidautinuose

varijantuose šio išradimo chimerinės molekulės įjungia šešias cisteino liekanas maždaug aukščiau nurodytose padėtyse ir turi pI maždaug tarp 9 ir 10. Šitas išradimas pareiškia nukleines rūgštis, koduojančias chimerinius neurotrofinius faktorius, o taip pat baltymus chimerinių neurotrofinių faktorių ir jų peptidinius fragmentus ir darinius. Pageidaujamuose varijantuose šio išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai įjungia dalį bent vieno nario iš neurotrofinų šeimos (žiūr. aukščiau), tame tarpe (bet neapsiribojant) NGF, BDNF, ir NT-3, kurių sekos pateiktos 11 Pav. Pageidaujamuose specifiniuose išradimo varijantuose chimeriniai neurotrofiniai faktoriai turi aminorūgštinę seką, pateiktą 5 ir 10 Pav. chimerinėms molekulėms R1-10, BM1, NM1 ir S1-S12. Molekules chimerinių neurotrofinių faktorių šio išradimo įjungia, neapsiribojant, tas, kurios turi kaip pirminę aminorūgštinę seką visą arba dalį aminorūgštinės sekos, kaip parodyta 5 ir 10 Pav., įjungiant pakeistas sekas, kuriose funkciškai ekvivalentinės aminorūgštinės liekanos pakeistos liekanomis sekoje, duodančioje ramų pakeitimą. Pavyzdžiui, vieną ar daugiau aminorūgštinių liekanų toje sekoje galima pakeisti kita aminorūgštimi analogiško poliarizmo, kuri veikia kaip funkcinis ekvivalentas, gaudama ramų pakeitimą. Aminorūgštys pakeitimui sekoje gali būti pasirinktos iš kitų klasės narių, kuriam priklauso aminorūgštis. Pavyzdžiui, nepoliarinės (hidrofobinės) aminorūgštys, įskaitant alaniną, leuciną, izoleuciną, valiną, proliną, fenilalaniną, triptofaną ir metjoniną. Poliarinės neutralios aminorūgštys, įskaitant gliciną, seriną, treoniną, cisteiną, tiroziną, asparginą ir glutaminą. Teigiamai užkrautos (bazinės) aminorūgštys, įskaitant argininą, liziną ir histidiną. Neigiamai užkrautos (rūgštinės) aminorūgštys, įskaitant asparagino rūgštį ir glutamino rūgštį. Į šio išradimo apimtį taip pat įjungti baltymai arba fragmentai arba jų dariniai, priklausantys chimeriniams neurotrofiniams faktoriams, kurie modifikuoja diferencijuotai per ar po translacijos, pavyzdžiui, glikozilinimo metu, proteolitinio skaldymo, surišant su antikūno ar kito ląstelinio ligando molekule ir taip toliau. Šis išradimas taip pat pasiūlo molekules nukleinių rūgščių, kurios koduoja aminorūgštines sekas, pateiktas 5 ir 10 Pav., arba jų dalis ar funkcinius ekvivalentus. Be to, šis išradimas pasiūlo plazmidės pBJ51mN/hB-S1 iki S12, pC8hB/mN-R1 iki R10, pC8hmN/myc-NM1 ir pC8hB/myc-BM1, pateiktas 10 Skyriuje, žemiau, o taip pat nukleorūgštines sekas, koduojančias chimerinius neurotrofinius faktorius, kurie yra šiose plazmidėse.

Šis išradimas pasiūlo chimerinius neurotrofinius faktorius, kurie įjungia ląstelinį faktorių, bet kurio gyvo organizmo kilmės, įskaitant, pavyzdžiui, žmogaus, beždžionės, kiaulės, avies, jaučio, arklio, šuns, katės, paukščio ląstelinius faktorius.

5.2. CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ KONSTRAVIMAS

Nukleinės rūgštys, koduojančios chimerinius neurotrofinius faktorius, gali būti sudarytos panaudojant standartinius rekombinantinių DNR (geninės inžinerijos) metodus, pavyzdžiui, supjaustant ir suauginant nukleinę rūgštį, koduojančią ląstelinius faktorius ir/arba kitus peptidus, panaudojant restrikcinius fermentus ir DNR-ligazes. Alternatyviai, nukleinių rūgščių sekos gali būti sudarytos, panaudojant cheminę sintezę, pavyzdžiui, tvirtafazę fosforamidinę technologiją. Išradimo pageidautinuose varijantuose polimerazės-grandininę reakciją (PCR; Saiki et al., 1985, Science 230:1350-1354) galima panaudoti, kad įvykdyti nukleinių rūgščių sekos splaisingą išplėtimo būdu (Horton et al., 1989, 77:61-68), tuo pačiu produkuojant pateikto išradimo chimerinius neurotrofinius faktorius. Kaip detalai išnagrinėta 6 Skyriuje, žemiau, chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali būti gauti vienlaipie PCR, panaudojus tris oligonukleotidinius praimerus arba, alternatyviai, trilaipie PCR, panaudojus keturis oligonukleotidinius praimerus. 1 ir 2 Pav. pateiktas schematinis vaizdas šių dviejų metodikų. Pavyzdžiui, nukleinę rūgštį, koduojančią bent dalį ląstelinio faktoriaus (X), galima priversti vykdyti splaisingą iki nukleorūgštinės sekos, koduojančios eukariotinį peptidą (V), sudarius tris oligonukleotidinius praimerus, vienas iš kurių atitinka daliai sekos X ("X praimeris"), kitas atitinka daliai sekos Y ("Y praimeris"), o trečias turi dalį abiejų sekų X

ir Y ("XY praimeris"). Taip pat pageidautina inkorporuoti tinkamus saitus į praimerus restrikcijos endonukleazų skaldymui. 3 Lentelėje žemiau pateikti praimerių pavyzdžiai, kuriuos galima panaudoti, kad gauti chimeras BDNF-NGF. Šiuos tris oligonukleotidus (pateikti 1 Pav. kaip praimeriai A, C ir B, atitinkamai) galima apjungti vienlaiptėje PCR, ir pageidautina, kad praimeriai X ir Y dalyvautų didesniais kiekiais, negu praimeris XY, pavyzdžiui, su santykiais X:XY:Y apie 100:1:100. Matrica, naudojama PCR, gali būti mišinys nukleotidinių rūgščių, koduojančių ląstelinį faktorių ir peptidą arba baltymą, skirtus splaisingui. Padėtis saito splaisingo apspręsta tiltelinio nukleotido (pavyzdžiui, praimerio XY). Sąlygos amplifikacijos, paprastai naudojamos šioje technikoje srityje, gali būti, pavyzdžiui, tokios: 1 minutė prie temperatūros apie 94°C, 2 minutės prie temperatūros apie 43°C ir 3 minutės prie temperatūros apie 72°C laike 35 ciklų, panaudojus standartinius tirpalus ir metodus polimerazės-grandininės reakcijos. Gautas PCR-fragmentas po to gali būti išvalytas gelyje, panaudojus gelioelektroforezę, suskaidytas atitinkamais endonukleazų restrikcijos fermentais ir po to insercijuotas į tinkamą vektorių klonavimui.

Alternatyviai, kaip parodyta 2 Pav., chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali būti gauti trilaipėje PCR, panaudojus keturis nukleotidus. Oligonukleotidai, kurie gali, pavyzdžiui, būti panaudoti, kad gauti chimeras BDNF-NGF arba NGF-BDNF, pateikti 4 ir 10 Lentelėse, atitinkamai. Kad įvyktų splaisingas tarp nukleotidinių sekų X ir Y galima sudaryti tokius praimerus: (I) praimeris X, atitinkantis sekai X (A praimeris 2 Pav.); praimeris Y, atitinkantis sekai Y (D praimeris 2 Pav.); praimeris XY, atitinkantis abiem sekom X ir Y (B praimeris 2 Pav.), o taip pat praimeris XY', taipogi atitinkantis subsekom abiejų X ir Y, bet papildomai homologinis prameriui XY (C praimeris 2 Pav.). Vienoje reakcijoje PCR praimeriai X ir XY amplifikuoja iš matricos sekas X, ir gauna nukleotidinę rūgštį, įjungiančią dalis sekų X ir Y. Kitoje reakcijoje PCR praimeriai Y ir XY' amplifikuoja iš matricos sekas X ir gauna nukleotidinę rūgštį, įjungiančią dalis sekos X ir Y, kuri persidengia su dalimi Y molekulės nukleotidinės rūgšties, gautos kitoje PCR reakcijoje. Kai produktai dviejų PCR apjungti ir amplifikuoti su pagalba PCR, gali būti gauta nukleotidinė molekule, turinti sekos Y insercijas sekoje X. Šio metodo modifikacija, panaudojus dvi skirtingas matricas, taip pat gali būti pritaikyta atitinkamai šiam išradimui. Reakciją PCR, išvalymą PCR produktų ir suskaldymą su restrikcijos endonukleazės fermentais galima po to panaudoti chimerinio neurotrofinio faktoriaus gauto geno klonavimui, pagal žemiau pateiktą aprašymą.

Reakcijos DNR-produktus galima klonuoti, panaudojus žinomą metodą. Galima panaudoti visą eilę žinomų iš literatūros sistemų vektorius-šeimininkas. Galimi vektoriai apjungia, pavyzdžiui, kosmidės, plazmidės ar modifikuotus virusus, tačiau vektorinė sistema turi būti suderinama su naudojama žyme-šeimininke. Į tokius vektorius įeina, pavyzdžiui, bakteriofagai, tokie kaip liambdadariniai, arba plazmidės tokios, kaip pBP322, arba plazmidiniai dariniai Bluescript R (Stratagenas). Rekombinantinės molekulės gali būti introdukuotos į ląsteles-šeimininkes per transformaciją, transfekciją, infekciją, elektroporinimą ir taip toliau.

5.3 CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ EKSPRESIJA

Nukleotidinę seką, koduojančią chimerinio neurotrofinio faktoriaus baltymą arba jo dalį, galima insercijuoti į tinkamą ekspresuojantį vektorių, tai yra, vektorių, kuris turi būtinus elementus transkripcijai ir translacijai insercijuotai baltymą-koduojančiai sekai. Būtinai transkripcijai ir translacijai signalai taip pat gali būti pateikti gamtinio geno chimerinio neurotrofinio faktoriaus ir/arba jo flanginėmis dalimis. Galima panaudoti visą eilę sistemų vektorius-šeimininkas baltymą-koduojančios sekos ekspresijai. Į tokias sistemas įeina, pavyzdžiui, sistemos žinduolių ląstelių, užkrėstos viruso (pavyzdžiui, raupų viruso vakcinos, adenoviruso ir taip toliau); sistemos vabzdžių ląstelių, užkrėstos viruso (pavyzdžiui, bakuloviruso); mikroorganizmai tokie, kaip mielės, turinčios mielinis vektorius, arba bakterijos, transformuotos bakteriofago DNR, plazmidinės DNR arba kosmidinės DNR. Šių

vektorių ekspresuojantys elementai varijuoja pagal jų atsparumą ir specifiškumą. Priklausomai nuo naudojamos sistemos vektorius-šeimininkas galima panaudoti bet kokius iš daugybės tinkamų transkripcinių ir transliacinių elementų. Ekspresuojančių vektorių sudarymui, turinčių geną chimerinio neurotrofinio faktoriaus, kuris įjungia atitinkamus signalus transkripcinės/transliacinės kontrolės ir baltymą koduojančias sekas, galima panaudoti bet kurį iš būdų, anksčiau aprašytų insercijai DNR-fragmento į vektorių. Į šiuos būdus gali įeiti metodikos rekombinantinių DNR in vitro ir sintetinės metodikos, o taip pat rekombinacijos in vivo (genetinė rekombinacija). Ekspresiją nukleorūgštinės sekos, koduojančios baltymą chimerinio neurotrofinio faktoriaus ar peptidinį fragmentą, galima kontroliuoti su antra nukleorūgštine seka tam, kad baltymas ar peptidas chimerinio neurotrofinio faktoriaus būtų ekspresuotas šeimininke, transformuotame su molekule rekombinantinės DNR. Pavyzdžiui, ekspresija chimerinio neurotrofinio faktoriaus gali būti kontroliuojama bet kurio elemento promotorius/ekspanseris, žinomu duotoje technikos srityje. Promotoriai, kurie gali būti panaudoti reguliavimui ekspresija chimerinio neurotrofinio faktoriaus, tai yra, pavyzdžiui, citomegalovirusinis (CMV) promotorius, sritis ankstyvo promotoriaus SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), promotorius, esantis 3' ilgio galiniame pakartojime viruso Rauso sarkomos (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), promotorius herpeso timidinkinazės (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:144-145), reguliatorinės sekos geno metalotionino (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); prokariotiniai ekspresijos vektoriai, tokie kaip beta-laktamazinis promotorius (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731) arba tac-promotorius (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25); žiūr. taip pat "Naudingi baltymai iš rekombinantinių bakterijų" Scientific American, 1980, 242:74-94; augaliniai ekspresijos vektoriai, įjungiantys promotorinę sritį nonalinsintetazės (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) arba RNR-promotorius ³⁵S kopūstų mozaikos viruso (Gardner et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), o taip pat promotorius fotosintetinio fermento ribulozobifosfatkarboksilazės (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); promotoriniai elementai iš mielių ar grybelių, pavyzdžiui, promotorius Gal 4, ADC (alkocholdehidrogenazė)promotorius, FGK (fosfoglicerinkinazė)-promotorius, promotorius šarminės fosfatazės bazėje, ir kitos gyvūnų transkripcinės kontrolės sritys, kurios išreiškia audiniui specifiškumą ir naudojamos transgeniniuose gyvūnuose: sritis valdanti elastazės 1 geną, kuri yra aktyvi pankreatinėse acinarinėse ląstelėse (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); sritis valdanti insulino geną, kuri aktyvi pankreatinėse beta ląstelėse (Hanahan, 1985, Nature 315:115-1220, sritis valdanti geną imunoglobulino, kuri aktyvi limfoidinėse ląstelėse (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), sritis valdanti virusą pelės pienliaukės auglio, kuri yra aktyvi testikulinėse, krūtinės, limfoidinėse ir pieno-liaukos ląstelėse (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), sritis valdanti albumino genomą, kuri yra aktyvi kepenyse (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268-276), alfa-fotoproteino geną valdanti sritis, kuri yra aktyvi kepenyse (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); alfa-1antitripsino geną valdanti sritis, kuri yra aktyvi kepenyse (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), betaglobulino geną valdanti sritis, kuri yra aktyvi mieloidinėse ląstelėse (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kolliad et al., 1986, Cell 46:89-94), sritis valdanti mielino bazinio baltymo geną, kuri yra aktyvi oligodendrocitų ląstelėse smegenyse (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); sritis valdanti lengvos grandies-2 miozino geną, kuri yra aktyvi skeleto raumenyse (Sani, 1985, Nature 314:283-286), ir sritis valdanti gonadotropinį išlaisvinimo hormono geną, kuri yra aktyvi hipotalamuse (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Ekspresuojančius vektorius, turinčius intarpus geno chimerinio neurotrofinio faktoriaus, galima identifikuoti trim pagrindiniais keliais: (a) DNR-DNR hibridizacija, (b) buvimas ar nebuvimas "markerinio" geno funkcijų ir (c) insercijuotų sekų ekspresija. Pirmu keliu buvimą svetimų geno, insercijuoto į ekspresuojantį vektorių, galima aptikti DNR-DNR hibridizacija, panaudojus zondus, turinčius sekas, homologines insercijuotam genui chimerinio neurotrofinio faktoriaus. Kitu keliu rekombinantinę sistemą vektorius/šeimininkas galima identifikuoti ir išrinkti remiantis buvimu ar nebuvimu "markerinio geno funkcijų" (pavyzdžiui, timidinkinazinio aktyvumo, rezistentiškumo antibiotikams, transformacinio fenotipo, susidarius įjungimo kūnams bakulovirusė ir taip toliau), išsautų insercija svetimų genų į vektorių. Pavyzdžiui, jeigu genas chimerinio neurotrofinio faktoriaus insercijuotas sekoje vektoriaus markerinio geno, rekombinantai, turintys chimerinę neurotrofinę faktorių kaip intarpą, gali būti identifikuoti remiantis markerinio geno funkcijų nebuvimu. Trečiu keliu vektoriai rekombinantinės ekspresijos gali būti identifikuoti, analizuojant svetimų geno produktą, ekspresuoto rekombinantu. Tokios analizės gali remtis, pavyzdžiui, fizinėmis arba funkcinėmis chimerinio neurotrofinio faktoriaus geninio produkto savybėmis biologinių prabų sistemoje, kuri aprašyta, žemiau, Skyriuje 5.4.

Po identifikacijos ir konkrečios rekombinantinės DNR molekulės išskyrimo, jos išdauginimui galima panaudoti kelis būdus, gerai žinomus duotos srities technikoje. Nustatius tinkamą šeimininko sistemą ir auginimo sąlygas, rekombinantinius ekspresuojančius vektorius galima išdauginti ir gauti jų tam tikrą kiekį. Kaip pažymėta aukščiau, į naudojamus ekspresuojančius vektorius įeina, pavyzdžiui, tokie vektoriai arba jų derivatai (dariniai): žmogaus arba gyvūnų virusai, tokie kaip raupų vakcinos virusas ar adenovirusas; vabzdžių virusai, tokie kaip bakulovirusas; mielių vektoriai; bakteriofaginiai vektoriai (pavyzdžiui, liambda), o taip pat plazmidiniai ir kosmidiniai DNR-vektoriai. Be to, galima išrinkti štamą ląstelės-šeimininko, kuris moduliuoja ekspresiją insercijuotų sekų arba modifikuoja ir perdirba geninį produktą specifiniu būdu. Ekspresiją iš kai kurių promotorių galima padidinti, esant tam tikriems induktoriams; taip, pavyzdžiui, galima kontroliuoti ekspresiją chimerinio neurotrofinio faktoriaus baltymo, gauto geninės inžinierijos metodais. Be to, skirtingos ląstelės-šeimininkai turi charakteringus ir specifinius baltymų transliacinio ir post-transliacinio procesingo ir modifikacijos (pavyzdžiui, glikozilinimas, skaldymas) mechanizmus. Tinkamos ląstelių linijos ar šeimininko sistemos gali būti atrinktos tam, kad garantuotų būtiną modifikaciją ir procesingą ekspresuoto svetimų baltymo. Pavyzdžiui, ekspresiją bakterinėje sistemoje galima panaudoti, kad gauti baltyminį produktą su neglikozilintu branduoliu. Ekspresija mielėse duos glikozilintą produktą. Ekspresiją žinduolių ląstelėse galima panaudoti, kad užtikrinti "natūralų" glikozilinimą chimerinio neurotrofinio faktoriaus heterologinio baltymo. Be to, skirtingos sistemos ekspresijos vektorius/šeimininkas gali įvairiu laipsniu įtakoti į procesingo reakcijas, tokias kaip proteolitinis skaldymas.

Šio išradimo specifiniuose varijantuose DNR, koduojančias chimerinius neurotrofinius faktorius, galima ekspresuoti sistemoje ląstelių COS atitinkamai metodams, pateiktiems Skyriuose 6 ir 8, žemiau. Po rekombinanto identifikacijos, kuris ekspresuoja geną chimerinio neurotrofinio faktoriaus, geninis produktas turi būti analizuojamas. Tokia analizė paremta fizinėmis ir funkcinėmis produkto savybėmis. Žiūrėti Skyrių 5.4.

Po to, kai identifikuotas chimerinio neurotrofinio faktoriaus baltymas, jį galima išskirti ir išvalyti standartiniais metodais, tokiais kaip chromatografija (pavyzdžiui, jonų pakeitimo, afininė ir gelio-filtracinė kolonėlinė chromatografija), centrifūgavimas, diferencialinis tirpumas, arba naudojant bet kurią kitą standartinę baltymų išvalymo metodiką. Be to, šio išradimo chimerinių neurotrofinių faktorių baltymai ir peptidai gali būti gauti, panaudojus cheminės peptidinės sintezės standartines metodikas, kurios irgi yra gerai žinomos duotos srities technikoje.

5.4. NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ ANALIZĖS DĖL CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ

Šio išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai išreiškia neurotrofinį aktyvumą. Panaudotas čia terminas "neurotrofinis aktyvumas" siejasi su biologiniu poveikiu į nervų sistemos ląsteles, pavyzdžiui, neuronus, astroцитus, glijines ląsteles, oligodendroцитus, glijinius makrofagus ir Švano ląsteles (lemocitus). Biologinis efektas - tai pakitimai struktūroje ir/arba nervų sistemos ląstelės fiziologijoje, kuris neįvyksta, nesant chimerinio neurotrofinio faktoriaus poveikio tiesioginio arba per tarpininkus. Pavyzdžiai biologinio efekto tai yra išgyvenimo prailginimas, neuritų išaugimas, išsugojimas arba išvystymas diferencijuotų funkcijų (tokių kaip fermento ekspresija, pavyzdžiui, cholinacetiltransferazės arba tirozinhidroksilazės) arba, atvirkščiai, ląstelių mirtis arba dediferencijacija.

Neurotrofinio aktyvumo buvimą galima nustatyti, panaudojus bet kurią žinomą tokio aktyvumo analizę, o taip pat sistemas, kurios gali būti sukurtos ateityje. Biologinės analizės sistemos tai gali būti sistemos testavimo in vitro, tokios kaip audinių kultūros biologinių prabų sistemos, panaudojus audinių eksplantatus, ląsteles gautas iš audinių, arba imortalizuotas ląstelių linijas, pavyzdžiui, gautas iš galvos smegenų, nugaros smegenų arba periferinės nervų sistemos, o taip pat sistemos testavimo in vivo, kuriose chimerinis neurotrofinis faktorius gali būti įvestas gyviui; neurotrofiniai efektai gali būti nustatyti tokiam gyviui, panaudojus jam cheminius, histologinius ar elgesinius testus. Be to, chimerinis neurotrofinis faktorius gali būti inkorporuotas transgeno pavidalu į transgeninį gyvį nežmoginio tipo, o jo biologiniai poveikiai gali būti išmatuoti nurodytam gyviui. Pavyzdžiui, neurotrofinį aktyvumą galima išmatuoti panaudojus bet kurią iš tokių biologinių prabų sistemą, gerai žinomą specialistams: (I) sistema dorsalinės šaknelės ganglijaus, kaip aprašyta darbe Barde et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1199-1203, kuri įvesta į duotą aprašymą kaip nuoroda; (II) sistema mazginio ganglijaus analizės, kaip aprašyta darbe Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319-328, kuri įvesta į duotą aprašymą kaip nuoroda; (III) simpatinio ganglijaus analizė, kaip aprašyta darbe Barde et al., 1982, EMBOJ 1:549-553, kuri įvesta į duotą aprašymą kaip nuoroda; (IV) krumplyninio mazgo analizė, kaip aprašyta darbe Adler et al., 1979, Science 204:1434-1436, kuri įvesta į duotą aprašymą kaip nuoroda; (V) nugaros smegenų neuronai. Nugaros smegenis galima pašalinti tiriamam gyviui aseptiškai, perpjovus kaudaliai ir išlaisvinus nuo sensorinio ganglijaus ir smegenų. Po to nugaros smegenys gali būti padalinti į ventralinius ir mediodorsalinius segmentus atskiroms kultūroms, o audiniai supjaustyti į smulkius gabalėlius ir disocijuoti milteliais per Pastero pipetę į 50% DMEM (Lanksčiai) ir 50% Hemso F12 maitinančio mišinio (Lanksčiai), papildyto 33 mM gliukozės, 2 mM glutamino, 15 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 25 mkg/ml insulino, 100 mkg/ml transferino, 60 mkm putrescino, 20 nM progesterono, 30 nM Na-selenito, 0.5 mkg/ml penicilino G, 0.5 mkg/ml streptomicino ir 2.5 mkg/ml jaučio serumino albumino. Miltelinimą po to galima pakartoti du kartus ir supernatantus galima sugrupuoti ir nufiltruoti per 40 mkm filtrą Tetko. Disocijuotas ventralines ląsteles po to galima pasėti į lėkšteles kultivavimui, padengtas poli-D-lizinu (10 mkg/ml), su tankiu 0.5 milijono ląstelių į 35 mm lėkštelę. Disocijuotas mediodorsalines ląsteles galima pasėti su tankiu 1.5 milijono ląstelių į 35 mm lėkštelę, padengta poli-D-lizinu (10 mkg/ml), poli-L-ornitinu (10 mkg/ml) arba poli-L-ornitinu plus lamininas (5 mkg/ml); (VI) priekinių smegenų bazaliniai cholinerginiai neuronai (nuoroda į paraišką patentui JAV Nr. 07/400591); (VII) vidurinių smegenų ventraliniai dopaminerginiai neuronai (nuoroda į paraišką patentui JAV Nr. 07/400591); (VIII) ląstelės PC12.

5.5. ANTIKŪNAI, NUTAIKYTI Į CHIMERINIUS NEUROTROFINIUS FAKTORIUS

Atitinkamai šiam išradimui baltymas, chimerinių neurotrofinių faktorių fragmentai ar dariniai gali būti panaudoti kaip imunogenas chimerinių neurotrofinių faktorių antikūnų generavimui. Kad padidinti imuninio atsako į chimerinius neurotrofinius faktorių sukėlimo tikimybę, chimerinio neu-

retrofinio faktoriaus aminorūgštinę seką galima analizuoti, siekiant identifikuoti molekules sritis, kurios gali asocijuotis su padidintu imunogeniškumu. Pavyzdžiui, aminorūgštinę seką galima analizuoti su kompiuteriu, kad identifikuoti paviršinius epitopus atitinkamai metodui Hopp and Woods (1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828), kuris su pasisekimu naudojamas identifikuoti antigeninius peptidus paviršinio antigeno Hepatito B. Alternatyviai, galima palyginti iš įvairių rūšių išvestas chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštines sekas, o santykinai nehomologinės sritys gali būti identifikuotos; šitos nehomologinės sritys įvairiose rūšyse bus labiau imunogeninės.

Kad gauti monokloninius antikūnus, nutaikytus į chimerinį neurotrofinį faktorių, galima panaudoti bet kurią metodiką, kurį duoda antikūno molekulės iš stabilų ląstelių linijų kultūros. Pavyzdžiui, šiame išradime tokios metodikos, kaip hibridomo-metodika, pirmąkart sudaryta Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497), o taip pat triomo-metodika, metodika hibridomos žmogaus B-ląstelių (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) ir metodika hibridomos EBV, kad

gauti žmogaus monokloninius antikūnus (Colo et al., 1985, darbe "Monokloniniai antikūnai ir gydymas nuo vėžio", Alan R. Liss, Inc P. 77-96), o taip pat kitos metodikos. Monokloniniai antikūnai terapiniam panaudojimui gali būti žmogaus monokloniniai antikūnai arba chimeriniai žmogauspelės (arba kitų rūšių) monokloniniai antikūnai. Žmogaus monokloniniai antikūnai gali būti gauti bet kuriuo būdu, iš daugelio žinomų šios srities technikoje (pavyzdžiui, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92: 3-16). Gali būti gautos chimerinių antikūnų molekulės, turinčios pelės antigeną-surišantį domeną su žmogaus konstantinėmis sritimis (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851; Takeda et al., 1985, Nature 314:452).

Įvairūs būdai žinomi iš literatūros, gali būti panaudoti kad gauti poliklonalinius antikūnus chimerinio neurotrofinio faktoriaus epitopams. Kad gauti antikūnus įvairūs gyviašeiminkai gali būti imunizuoti su chimerinio neurotrofinio faktoriaus baltymo injekcija, tame tarpe, pavyzdžiui, triušis, pelė, žiurkė ir taip toliau. Kad padidinti imunologinį atsaką gali būti panaudoti įvairūs adjuvantai, priklausomai nuo šeimininko rūšies, ir į juos įeina, pavyzdžiui, Freindo stimulatorius (pilnas ir nepilnas), mineraliniai geliai, tokie kaip aliuminio hidroksidas, medžiagos aktyvaus-paviršio, tokios kaip lizolecitinas, plurono polioliai, polianijonai, peptidai, alyvinės emulsijos, hemocianinai, dinitro-fenolas, o taip pat potencialiai naudingi žmogaus stimulatoriai tokie, kaip BCG (Bacille Calmette-Cuerin) ir Corynebacterium parvum.

Antikūno molekulinis klonas chimerinio neurotrofinio faktoriaus epitopui gali būti gautas žinomais būdais. Metodika rekombinantinių DNR (žiūr., pavyzdžiui, Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) gali būti panaudota, kad sukurti nukleorūgštines sekas, kurios koduoja monokloninio antikūno molekulę arba jos surišimo su antigenu sritį.

Antikūnų molekulės gali būti išvalytos žinomais metodais, pavyzdžiui, imunoabsorbine arba imunoafinine chromatografija, tokiais chromatografijos metodais, kaip skysčių aukšto išskyrimo chromatografija, arba kombinacija duotų metodų.

Fragmentai antikūnų, kurie turi molekulės idiotipą, gali būti gauti žinomomis metodikomis. Pavyzdžiui, į tokius fragmentus įeina, be apribojimų: fragmentas $F(ab')_2$, kuris gali būti gautas pepsinui virškinant antikūno molekulę; fragmentai Fab' , kurie gali būti gauti atstačius disulfidinius tiltelius fragmento $F(ab')_2$, o taip pat fragmentai 2 Fab arba Fab , kurie gali būti gauti veikiant antikūno molekules su papainu.

5.6. IŠRADIMO NAUDINGUMAS

Šis išradimas siūlo chimerinių neurotrofinių faktorių genus, o taip pat jų baltymus, kurie gali būti panaudoti su įvairia diagnostine ir terapine paskirtimi. Šio išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai įjungia molekules, kurios (I) apjungia aktyvumą dviejų neurotrofinių faktorių vienoje molekulėje; (II) turi unikalių aktyvumo spektrą atžvilgiu gamtinės kilmės faktorių; (III) funkcionuoja kaip superagonistai gamtinės kilmės faktoriaus; arba (IV) funkcionuoja kaip antagonistai arba inhibitoriai gamtinės kilmės faktoriaus.

Pasiūlyto išradimo chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali būti panaudoti diagnostiniais tikslais. Pavyzdžiui, chimeriniai neurotrofiniai faktoriai šio išradimo įjungia peptidą tag, tokį kaip myc tag (žiūr. 7 Skyrių, žemiau), kuris gali susirišti su žymėtu antikūnu. Toks chimerinis neurotrofinis faktorius gali būti surištas su ląstelėmis, atsakingomis už neurotrofinį faktorių, ir, su pagalba surišančios žymės, gali tarnauti kaip indikatorius ląstelių, atsakingų už neurotrofinį faktorių, o duota metodika gali būti naudinga diagnozuojant arba tiriant nervų sistemos pažeidimus. Pageidautina, pagaminti chimerinį neurotrofinį faktorių diagnostiniams tikslams, kuris turėtų minimalų neurotrofinį aktyvumą.

Šis išradimas taip pat siūlo chimerinių neurotrofinių faktorių panaudojimą įvairiais terapiniais sumetimais. Chimeriniai neurotrofiniai faktoriai užtikrina pirmenybę, tam tikrais atvejais, pasiekiant aktyvumą, paprastai asocijuotą su keliais neurotrofiniais faktoriais vienoje molekulėje, ir/arba išplėtimą aktyvumo diapazono už giminingos chimerinės molekulės aktyvumo ribų. Pavyzdžiui, chimeros NM1, turinčios NGF, surištą su myc-antigeniniu peptidu, išreiškia aktyvumą biologinėse analizėse, panaudojus dorsalinės šaknelės ganglijų, mazginį ganglijų ir simpatinių ganglijų; priešingai, prigimtinis NGF parodo nežymų (arba nulinį) aktyvumą mazginio ganglijaus analizėse. Tuo remiantis, NM1 turi išplėstą aktyvumo diapazoną, nes veikia į tuos ląstelių tipus, kurie, kaip taisyklė, nėra atsakingi už tėvinę molekulę, tai yra NGF. Ši aplinkybė ypač svarbi tais atvejais, kai pageidautina indukuoti atsaką simpatiniuose, parasimpatiniuose ir sensoriniuose neuronuose, pavyzdžiui, esant amiloidinei polineuropatijai, diabetinei neuropatijai ir disautonominei polineuropatijai. Nors dorsalinės šaknelės ganglijus, simpatinius ganglijus ir mazginis ganglijus gali būti atsakingi už neurotrofinių kombinacinį poveikį, pavyzdžiui, BDNF ir NGF, arba tiktai faktoriaus NT-3, chimerinė molekulė, pažeidžianti visus tris ląstelių tipus, gali būti santykinai laisva nuo pašalinių efektų, kurie gali būti iššaukti, įvedus BDNF plus NGF arba tiktai NT-3. Be to, chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali rodyti labiau išreikštą aktyvumą, negu jų sutinkami gamtoje oponentai, pavyzdžiui, kaip parodyta 6 Pav., BM1, įjungiantis dalis BDNF ir myc-peptido, įgauna aukštesnį aktyvumą skatinti išgyvenimą, nei BDNF dorsalinės šaknelės ganglijuje ir simpatiniame ganglijuje. Kaip nustatyta, NGF ir BDNF turi papildomą neurotrofinį aktyvumą; atitinkamai su šiuo išradimu vienintelis chimerinis neurotrofinis faktorius gali būti panaudotas, kad gauti aktyvumą daugybės giminingų faktorių vienoje molekulėje.

Šio išradimo papildomuose varijantuose chimeriniai neurotrofiniai faktoriai gali įjungti toksinį komponentą ir gali būti panaudoti, kad eliminuoti sergančias ląsteles, atsakingas už chimerinį neurotrofinį faktorių, pavyzdžiui, ląsteles arba auglius, užkrėstus viruso ir turinčius nervinės sistemos kilmę.

Įvairiuose varijantuose pateikto išradimo baltymas, peptidiniai fragmentai ar dariniai chimerinių neurotrofinių faktorių gali būti įvesti pacientams, kurių nervų sistema pažeista traumos, chirurginės invazijos, išemijos, infekcijos (pavyzdžiui SPiDo), metabolinio susirgimo, maistinių medžiagų deficito, piktybinių ar toksinių medžiagų. Išradimo papildomuose varijantuose baltymas, peptidiniai fragmentai ar dariniai chimerinių neurotrofinių faktorių gali būti panaudojami gydymui igimtų būvių ar neurodegeneratyvinių sutrikimų, įskaitant tame tarpe, pavyzdžiui, Alzheimerio ligą, senėjimą, periferines neuropatijas, Parkinsono ligą, paveldimą suaugusiųjų chorėją, o taip pat mo-

toneuronų ligas ir sutrikimus. Dabartinio išradimo specifiniame varijante įvedimą baltymo ar peptidinių fragmentų, arba chimerinių neurotrofinių faktorių darinių galima panaudoti, derinant su audinio chirurgine implantacija ar kitų kompozicijų prailguotu veikimu, gydant Alzheimerio ligą, pašalinę amiotrofinę sklerozę ir kitus motoneuroninius susirgimus (įskaitant, pavyzdžiui, Verdnigo-Hofmano ligą) ir Parkinsono susirgimus. Parodyta, kad Alzheimerio liga pasireiškia selektyviu cholinerginių neuronų praradimu priekinių smegenų bazaliniuose branduoliuose. Taip pat parodyta, kad maždaug 35% pacientų su Parkinsono liga kenčia nuo silpnaprotystės Alzheimerio tipo; todėl chimerinis neurotrofinis faktorius, gautas atitinkamai šiam išradimui, gali būti naudingas agentu šio kompleksinio susirgimo terapijoje. Analogiškai, chimerinis neurotrofinis faktorius, gautas atitinkamai šiam išradimui, gali būti panaudotas terapiškai gydant Alzheimerio ligą poroje su Dauno sindromu. Chimerinis neurotrofinis faktorius, gautas atitinkamai šiam išradimui, gali būti panaudotas, gydant visą eilę delecijų, o taip pat įgimtų sugebėjimų pažeidimus.

Šio išradimo kituose varijantuose baltymas, fragmentai ar dariniai chimerinių neurotrofinių faktorių gali būti panaudoti poroje su kitais citokinais, kad pasiekti pageidaujamą neurotrofinį efektą. Aktyvios kompozicijos pasiūlyto išradimo, į kurias gali įeiti chimerinis neurotrofinis faktorius, įskaitant baltymą, peptidiniai fragmentai ar dariniai, arba antikūnai (ar antikūnų fragmentai) nutaikyti prieš baltymą, peptidiniai fragmentai ar dariniai chimerinių neurotrofinių faktorių, arba derinys chimerinio neurotrofinio faktoriaus su kitu agentu, tokiu kaip NGF, gali būti įvesti bet kuriam steriliame biosuderintame farmaciniame nešėjuje, įskaitant, pavyzdžiui, druskos tirpalą, buferinį druskos tirpalą, dekstrozę ir vandenį. Kiekis baltymo, peptidinio fragmento, neurotrofinio faktoriaus ar antikūno darinio, kuris bus efektyvus, gydant sutrikimus ar būvius, priklauso nuo sutrikimo ar būvio prigimties ir gali būti nustatytas standartiniais klinikiniais metodais. Kur galima, reikia nustatyti priklausomybės kreivę "dozė-efektas" ir išradimo farmacinę kompozicijas *in vitro*, pavyzdžiui, chimerinių neurotrofinių faktorių biologinės analizės sistemose, žemiau aprašytose, o po to testuotas su tinkamu gyvio modeliu prieš bandymą su gyviais.

Į įvedimo būdus įeina, pavyzdžiui, įvedimas į raumenis, įvedimas per pilvaplėvę, į veną, po oda, peroraliai ir per nosį. Be to, pageidautina šio išradimo farmacinę kompoziciją įvesti į centrinę nervų sistemą bet kuriuo tinkamu būdu, įskaitant intraventrikulinę ir vidinių apdangalų injekciją; intraveninė injekcija gali būti palengvinta pagalba intraveninio kateterio, pavyzdžiui, prijungto prie rezervuaro, prie tokio kaip Ommay rezervuaras. Įvedimo būdai gali būti taip pat pateikti perkraunamais ar biologiškai irstančiais įrenginiais.

Be to, pageidautina šio išradimo farmacinę kompozicijas įvesti į lokalią sritį, reikalingą gydymo; tai pasiekama, pavyzdžiui, lokaliai įvedant chirurginio įsikišimo metu su pagalba injekcijų, su pagalba kateterio ar pagalba implantato, o nurodytas implantatas yra poringa, neporinga ar gelinė medžiaga, įskaitant membranas, tokias kaip sialastinės membranos, ar skaidulos. Šis išradimas taip pat siūlo farmacinę kompozicijas, turinčias baltymus, peptidinius fragmentus ar darinius chimerinio neurotrofinio faktoriaus, įvestus per liposomas, mikrodaleles ar mikrokapsules. Šio išradimo įvairiuose varijantuose galima panaudoti taip pat kompozicijas, kad pasiekti palaipsnių išlaisvinimą chimerinio neurotrofinio faktoriaus ir produktų, surišusių su chimeriniu neurotrofiniu faktoriumi.

6. PAVYZDYS: BDNF/NGF IR MYC-ŽYMETŲ CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ KONSTRAVIMAS IR EKSPRESIJA

Konstruoja visą eilę genetiškai modifikuotų molekulių NGF ir BDNF, siekiant ištirti, ar tokia modifikacija pakeis NGF ar BDNF veikimo specifiškumą. Konstravimas vykdomas, panaudojant polimerazės-grandininę reakciją (PCG), kad atlikti genų splaisingą ekstencijos būdu (Horton et al., Gene 77:61-68).

6.1 MEDŽIAGOS IR METODAI

6.1.1. CHIMERINIŲ MOLEKULIŲ KONSTRAVIMAS

Naudoja metodikas, prie kurių chimerinės molekulės gaunamos vienlaiptės polimerazės-grandinės reakcijos metu, panaudojus tris oligonukleotidinius praimerius arba, alternatyviai, trilaipte polimerazės-grandinėje reakcija, panaudojus keturis oligonukleotidinius praimerius. Šias metodikas naudoja, kad gauti devynias chimeras, pažymėtas R2-R10, į kurias įeina dalys sekų, koduojančių BDNF ir NGF, ir dvi chimeras, NM1 ir BM1, kuriose nukleininė rūgštis, koduojanti dalį myobaltymo, "žymėto" atžvilgiu NGF ir BDNF, atitinkamai; kur tag-seka yra tokia: glu-liz-leu-ile-ser-glu-glu-asn-leu. Chimeroms R1 hNGF amplifikuoja su 5'-oligo, turinčiam restrikcinių saitų ClaI, ir 3'-oligo, turinčiam saitą NotI. Fragmentą PCR (polimerazės-grandinės reakcijos) po to subklonuoja į saitus NarI/NotI ir plazmidės pC8hB(PI).

Kad gautų chimera R1 naudoja tokius oligonukleotidus: 5'-Oligo; 5'-GCTTACCTGATCGATCATCATCCCATCCCATCTTC; 3'-Oligo; 5'-GCTATGCGCCGCGGATCCTTATCATCTCACAGCC

6.1.1.1. CHIMERINIŲ MOLEKULIŲ KONSTRAVIMAS PANAUDOJUS VIENTAIPTE POLIMERAZĖS-GRANDININĘ REAKCIJĄ

1 Pav. pateiktas schematinis vaizdas trijų oligonukleotidų panaudojimo (pažymėta A, B ir C) vienlaiptėje polimerazės-grandinėje reakcijoje (PCR; Saiki et al., 1985, Science 230: 1350-1354), kad atlikti geninį splaisingą ekstencijos būdu, panaudojus būdo modifikaciją, pateiktą darbe Horton et al., (1989, Gene 77:61-68). Trys oligonukleotidus "A", "B", ir "C" paėmę santykiu 100:1:100 vienlaiptėje PCR panaudoja su dviem templatais hBDNF (ekspresuojanti plazmidė žmogaus BDNF ir pCD18, pažymėta kaip pC8-hB(PI)) ir hNGF (žmogaus sintetinis genas NGF, pristatytas iš British Biotechnology Ltd.). Per pirmus kelis ciklus asimetrinė amplifikacija duoda daugiausia viengrandininį produktą A-B, kurį po to amplifikuoja su pagalba oligonukleotido C, susidarant sintezės produktui A-C. Panaudojus šį metodą, pakeitimus didelių dalių molekulės BDNF įvykdo suliejant dalis molekulės subrendusio BDNF su dalimi molekulės NGF. Suliejimo padėtį nustato dėka vidurinio oligonukleotido ("B"), kuris susideda iš NGF sekos prie 5'-galo, ir BDNF sekos prie 3'-galo. Naudoja tokias amplifikacijos sąlygas: 1 minutė prie temperatūros 94°C, 2 minutės prie temperatūros 43°C ir 3 minutės prie temperatūros 72°C laike 35 ciklų. Fragmentą PCR valo su geliu, pervirškina su NarI/NotI ir subklonuoja į atitinkamas saitus plazmidžių pC8hB(PI). Šį metodą naudoja tam kad sudaryti chimeras R2-R5 (pažymėtos nuo pC8hB/hN-R1 iki pC8hB/hN-R5). 3 Lentelėje pateikti trys oligonukleotidai, naudojami kad gauti chimeras R2, R3, R4 ir R5, įskaitant 5'-oligonukleotidą (atitinkantį A praimerį 1 Pav.), vidurinis oligonukleotidas (atitinkantis B praimerį 1 Pav.) ir 3'-oligonukleotidas (atitinkantis C praimerį 1 Pav.).

3 LENTELĖ

Oligonukleotidiniai praimeriai, naudojami sudarant chimeras R2, R3, R4 ir R5

CHIMERA R2

5'-Oligo; 5'-GATGCTGCAAACATGTCCATG

Vidurinis oligo; 5'-CTTATCCCCAACCACACGCTAATACTGTACACACGCG 3'-Oligo; 5'-GCTATGCGGCCGCGGATCCTTATCATCTCACAGCC

Tuos pat 5'-oligo ir 3'-oligo panaudoja CHIMEROMS R3-R5

CHIMERA R3

Vidurinis Oligo; 5'-GACGGGATTTGGGTCCCGGCACTTGGTCTCGTAGAAG

CHIMERA R4

Vidurinis Oligo; 5'-GAGTTCCAGTGCTTTGAGTCTATGCCCCTGCAGCC

CHIMERA R5

Vidurinis Oligo; 5'-GACAAAGGTGTGACTCGTTCGGCACTGGGAGTTCCAATG

6.1.1.2. CHIMERINIŲ MOLEKULIŲ KONSTRAVIMAS, PANAUDOJUS TRILAIPTĘ POLIMERAZĖS-GRANDININĘ REAKCIJĄ

2 Pav. pateiktas schematinis vaizdas keturių oligonukleotidų panaudojimo (pažymėta A, B, C ir D) trilaiptėje polimerazės-grandininėje reakcijoje, kad įvykdytų geninį sujungimą ekstencijos būdu. Kadangi praimeriai B ir C įjungia dalį sekos NGF, galiniai reakcijos produktai bus molekulės, kuriose santykinai mažos sekos BDNF bus pakeistos seka NGF.

Kaip parodyta 2 Pav. hBDNF vektoriuje BLUESCRIPT (Stratagenas) amplifikuoja su pagalba 5'-oligonukleotido (A) ir vidurinio oligonukleotido (B), tada kai hBDNF plazmidėje pCDM8 amplifikuoja su viduriniu oligonukleotidu (C) ir 3'-oligonukleotidu (D). Šiuos du fragmentus PCR išvalo gelyje ir alikvotus apjungia tolimesnėje reakcijoje. Kadangi du viduriniai oligonukleotidai turi persidengiančias sekas NGF prie 5'-galo, du fragmentai PCR A-B ir C-D sugeba hibridizuotis tarpusavy su pagalba 5'- ir 3'-oligonukleotido, duodami PCR fragmentą, kuris turi nedidelį pakeitimą NGF. Šį fragmentą pervirškina su pagalba NarI/NotI ir klonuoja į atitinkamus saitus plazmidėje pC8-hB(PI). Panaudojus du templatų BDNF, klonuotus įvairiuose vektoriuose kaip pradinę medžiagą, kiekvienas su unikaliu galiniu oligonukleotidu (praimeris A ir D, atitinkamai) klaidina dėl netikrų negatyvų gavimo panašumo. Šį metodą panaudoja chimėrų R6-10 (pažymėtos pC8hB/hN-R6, pC8hB/hN-R7 - pC8hB/hN-R10) konstravimui. Dėl chimėros R5 tenka pasakyti, kad pIS-hB naudoja kaip templatą praimeriams A ir B, tada kai sintetinį hNGF naudoja kaip templatą praimeriams C ir D. 4 Lentelėje pateikti oligonukleotidiniai praimeriai, naudojami sudarant chimėras R6, R7, R8, R9 ir R10.

4 LENTELE

Oligonukleotidai, naudojami sudarant chimėras R6, R7, R8, R9, ir R10, NM1 ir BM1

CHIMERA R6

5' - Oligo (A)

5' - GATGCTGCAAACATGTCCATG

Vidurinis Oligo (B)

5' - GCCTTTCTAGAGAGCACACATACACAAGAAGTGTC

Vidurinis Oligo (C)

5' - GTGCTCTCTAGAAAGGC

3' - Oligo (D)

5' - GCTATGCGGCCGCGGATCTTATCATCTCACAGCC-3'

CHIMERA R7

5' - Oligo (A)

5' - GTAAAACGACGGCCAGT-3'

Vidurinis Oligo (B)

5' - CAGCACTGTCACCTCCTTGCCCGACATGTCCACTGC

Vidurinis Oligo (C)

5' - AAGGAGGTGACAGTGCTGGCCGAGGTCCCTGTATCAAAAGGC-3'

3' - Oligo (D)

5' - CAAAGATCCTCTAGAGTCGC-3'

Tie patys 5' ir 3' oligo buvo naudojami Chimeroms R8-R10

CHIMERA R8

Vidurinis Oligo (B)

5' - TCTGAATACACTGTTGTTAATAGGGACCTTTTCAAGGAC-3'

Vidurinis Oligo (C)

5' - ATTAACAACAGTGTATTTCAGACAATACTTCTACGAGACC-3'

CHIMERA R9

Vidurinis Oligo (B)

5' - AACAGGATTGGAGGCTCGGCACTTGGTCTCGTAGAA

Vidurinis Oligo (C)

5' - CGAGCCTCCAATCCTGTTGAGAGTGGCTGCAGGGGGCATAG

CHIMERA R10

Vidurinis Oligo (B)

5' - GTATGAGTTCCAGTGTTTGGAGTCTATGCCCCTGCAGCC

Vidurinis Oligo (C)

5' - TCCAAACACTGGAACCTCATACTGCCGAACCTACCCAGTCG

NM1

5' - Oligo

5' - CGGTACCCTCGAGCCACCATGCTGTGCCTCAAG-3'

Vidurinis Oligo

5' - CAGATCCTCCTCAGAAATCAGCTTTTGCTCACCTCCTCTTGTAGCCTTCCTG

3' - Oligo

5' - GCTATGCGGCCGCTACAGATCCTCCTCAGAAATC-3'

BM1

5' - Oligo

5' - CGGTACCCTCGAGCCACCATGACCATCCTTTTCCTT

Vidurinis Oligo

5' - GCTATGCGGCCGCTACAGATCCTCCTCAGAAATCAGCTTTTGCTCACCTCCTTT
AATGGTAATGTAC-3

3' - Oligo

5' - GCTATGCGGCCGCTACAGAATCCTCCTCAGAAATC-3'

6.1.1.3. CHIMERINIŲ MOLEKULIŲ, ĮJUNGANČIŲ MYC "TAG" KONSTRAVIMAS

Vienlaiptę reakciją PCR, panaudojus tris oligonukleotidinius praimerius, aprašytus aukščiau, naudoja konstruojant ekspresuojančias plazmides, koduojančias NGF ir BDNF, žymėtas su 10 aminorūgščių antigeniniu peptidiniu fragmentu žmogaus myc-baltymo (paraiška patentui JAV Nr. 07/532285, paduota 1990 metų birželio 1 d., kuri įvesta į duotą aprašymą kaip nuoroda). Vienlaiptės PCR metodiką naudoja, kad gauti PCR-produktą, turintį pelės NGF geną (iš plazmidės, koduojančios ilgą NGF pirmtaką), vadinamą pB15-NGF, surištą tilteliu, koduojančiu du glicinus, su seka, koduojančia myc-epitopą 10 aminorūgščių dydžio; praimeriai PCR sudaryti taip, kad duotų PCR-produktą, kuriame delecijuoti gamtinių genų NGF paskutiniai du kodonai, nes egzistuoja galimybė, kad aminorūgštys, koduojamos šiais kodonais, gali pateikti saitą proteolitinio skaldymo, duodantį myc-epitopo praradimą. Kad sudaryti mNGF, žymėto su myc prie 3'-galo (pažymėtas pC8hmN/myc-NM1), pelės NGF su ilgu prepro (20 ng) amplifikuoja su pagalba 5'oligonukleotido, vidurinio oligonukleotido ir 3' oligonukleotido su koncentracijom 100, 1 ir 100 ng, atitinkamai (3A Pav.). Naudoja tokias amplifikacines sąlygas: 1 minutė prie temperatūros 94°C, 2 minutės prie temperatūros 43°C ir 3 minutės prie temperatūros 72°C per 35 ciklus. Gautą PCR produktą po to pervirškina ir klonuoja į XhoI/MotI - pervirškintą vektorių CD18. BDNF, žymėtą myc-epitopu prie 3'-galo (pažymėtas pC8hB/myc-BM1), konstruoja panaudodami analogišką strategiją (3B Pav.).

Panašią metodiką naudoja, kad gautų PCR produktą, turintį geną žmogaus BDNF, surištą per tiltelį, koduojantį du glicinus, su seka, koduojančia myc-epitopą iš 10 amino rūgščių; kaip ir su chimera NGF/myc, PCR praimerius konstruoja taip, kad gauti PCR produktą, kuriame delecijuoti paskutiniai trys kodonai gamtinio geno BDNF, dėl galimybės to, kad amino rūgštys, koduojamos šiais kodonais, gali pateikti saitą proteolitinio skaldymo, duodantį myc-epitopo netekimą. PCR produktą po to pervirškina su pagalba NarI/NotI ir subklonuoja į tėvinę plazmidę ekspresijos žmogaus BDNF, pC8hB(PI), siekiant gauti ekspresuojančią plazmidę pC8hB/myc(BM1).

6.1.2. CHIMERINIO NEUROTROFINIO FAKTORIAUS EKSPRESIJOS KONSTRUKCIJŲ TRANSFEKCIJA IR EKSPRESIJA COS LĄSTELĖSE

Plazmidinę DNR kiekvienai žinduolių ekspresijos konstrukcijai, aprašytą aukščiau, gauna dvigubo sluoksniavimo cezio chlorido gradientu būdu. Išvalytą plazmidinę DNR po to transfekuoja bendros precipitacijos metodu kalcio fosfate (Chon and Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745 (1987)) į ląsteles COS-M5. Po to ląsteles COS-M5 pasėja į 60 mm indelius 24 valandas prieš transfekciją su tankiu 5×10^5 ląstelių į indelį ir 2.5 ml Iglo terpės, modifikuotos Dulbeko būdu, turinčios gliukozę (4500 mg/ml) ir 10% fetalinio veršiuko serumo. Po 48 valandų po transfekcijos surenka terpes biologinei prabai iš transfekautų ląstelių. Metabolinį žymėjimą irgi atlieka tuo pat metu (infra).

6.1.2.1. METABOLINIS GYDYMAS

Po 48 valandų po transfekcijos ląsteles COS-M5 patalpina į 3 ml beseruminės DMEM (Iglo terpė modifikuota Dulbeko metodu) be metjonino ir cisteino, ir turinčios insulino, transferino ir seleno. Ląsteles auginama minimalioje terpėje vieną valandą prie temperatūros 37°C 5% CO₂. Vieną mililitrą beseruminio DMEM pašalina ir ląsteles COS-M5 žymi su pagalba ³⁵S-metjonino ir ³⁵S-cisteino (100 mkkub. diuimų/ml) per 4 valandas. Supernatantą žymėtų ląstelių COS-M5 surenka ir analizuoja poliakrilamido gelio-elektroforeze su natrio dodecilsulfatu. 4 Pav. pateikta skiriamoji galia žymėtų hBDNF, mNGF, hBDNF/myc (chimera BM1) ir mNGF/myc (chimera NM1).

6.2. REZULTATAI IR APTARIMAS

Genų NGF ir BDNF dalis suaugina naudodami praimerių ekstenciją polimerazės-grandininėje reakcijoje. Chimerines molekules gauna su santykinai dideliais (chimeros R1-R5) arba mažais (R6-R10) ploteliais, pakeistais NGF sekomis. Aminorūgštinė chimera R1-R10 seka pateikta 5 Pav.

Chimeros R1-R6 įjungia dalis žmogaus BDNF ir žmogaus NGF, o chimeros R7-R10 įjungia dalis žmogaus BDNF ir pelės NGF. 5 Lentelėje pateikti suminiai rezultatai kiek maždaug užima BDNF ir NGF sekos chimeroje R1-R10.

5 LENTELĖ

Chimera	Nuoseklumas BDNF	Nuoseklumas NGF
R1	preposeka	pilna brandi seka
R2	preposeka	liekanos 18-120
R3	preposeka liekanos 1-58	liekanos 59-120
R4	preposeka liekanos 1-72	liekanos 73-120
R5	preposeka liekanos 1-81	liekanos 82-120
R6	preposeka liekanos 1-110	liekanos 111-120
R7	preposeka liekanos 1-33 liekanos 42-118	liekanos 34-41
R8	preposeka liekanos 1-43 liekanos 51-118	liekanos 44-50
R9	preposeka liekanos 1-58 liekanos 67-118	liekanos 59-66
R10	preposeka liekanos 1-72 liekanos 80-118	liekanos 73-79

Be to gaunamos chimerinės molekulės, kurios koduoja NGF ir BDNF, žymėtus antigeniniu peptidu iš 10 amino rūgščių baltymo myc. Išvestos aminorūgštinės sekos NGF/myc (chimera NM1) ir BDNF/myc (chimera BM1) pateiktos 5 Pav.

Chimerinės konstrukcijas transfekuoja į ląsteles COS-M5 bendros precipitacijos keliu kalcio fosfate. Chimerų R1-R10 ekspresiją įvertina metaboline žyme ir biologinio aktyvumo analize. Kad pademonstruoti ekspresiją NM1 ir BM1, ląsteles COS, transfekuotas su pagalba NM1 arba BM1, metaboliškai žymi ³⁵S/-metjoninu, supernatantams atlieka poliakrilamidinę gelio-elektroforezę, ir po to elektroforetiškai atskirtus baltymus transfekuoja prie neiloninės membranos ir atlieka autoradiografiją (4 Pav.). BDNF ir chimera BM1: pagrindinė juosta žymėto baltymo identifikuota kaip juosta dydžio 31 kDa, atitinkanti šių baltymų pirmtakui. Lyginant pirmtako juostos intensyvumą, matyti, kad šie du baltymai ekspresuoti santykinai vienodai. Šio baltymo juostos dydžio 31 kDa nėra takelyje COS-MOCK (takelis 1). NGF ir chimera NM1 stebima vienoda ekspresija šių baltymų suaugusių formų (maždaug 12.5 kDa). Kaip laukiama, myc-žymėtas NGF (NM1) migruoja kiek lėčiau, negu NGF. Visos chimeros BDNF/NGF (R1-R10) daugumoje ekspresuoja pirmtako baltymą 31 kDa dydžio lygiuose, analogiškuose BDNF ekspresijos lygiams.

7. PAVYZDYS: CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ R1-R10, BM1 IR NM1 NEUROTROFINIS AKTYVUMAS

7.1. MEDŽIAGOS IR METODAI

7.1.1. BIOANALIZĖS, NAUDOJANT AUDINIŲ EKSPLANTATUS

Visas chimeras (R1-R10, o taip pat BM1 ir NM1), įskaitant gamtinius BDNF ir NGF, ekspresuoja į ląsteles COS-M5, kaip aprašyta aukščiau. Supernatantams, surinktiems iš transfekuočių ląstelių, atlieka biologinę analizę, naudodami audinių eksplantatus ir disocijuotų ląstelių kultūras pagal jų gebėjimą indukuoti specifinių ganglijų neuritinę išaugą. Chimerų aktyvumą įvertina matuodami išgyvenamumą kultivuotų disocijuotų ląstelių iš dorsalinės šaknelės ganglijaus (DRG) arba simpatinės grandinės ganglijaus (SG). Mazgus atkerta iš viščiukų embrionų E8-9 ir surenka į seruminę terpę (DMEM, papildyta 10% veršiuko gemalo serumu, streptomycinu, penicilinu ir glutaminu). Po tripsinizacijos su pagalba 0.5% tripsino (Worthington) ląsteles atsargiai susmulkina į miltelius ir po to persėja į 60 mm plastmasinius indelius be dengimo. Stadija išankstinio pasėjimo (2-3 valandas) leidžia prisijungti ne-neuroninėms ląstelėms. Neprijungtas neuronines ląsteles po to grupuoja, centrifuguoja, resuspenduoja seruminėje terpėje ir suskaičiuoja hemocitometru. Neuronų išgyvenimą galima įvertinti arba suskaičiuojant ląstelių skaičių, arba kolorimetrinės analizės būdu, remiantis virtimu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas) į purpurinį produktą, veikiant gyvybingoms ląstelėms. Kad suskaičiuoti ląsteles, jas pasėja su tankiu 24000 ląstelių/35 mm indelyje ir kultivuoja 48 valandas, esant ar nesant supernatantui COS, turinčiam ekspresuotų chimerų baltymo. MTT metodui ląsteles pasėja su tankiu 1000 ląstelių/A2-įdubime. Praėjus 40 valandų po pasėjimo, prideda dažą MTT su koncentracija 0.5 mg/ml. Gyvybingų ląstelių paimtą dažą soliubizuoja, pridėdami 0.08 n. HCl tirpalo izopropanolyje po 8 valandų, ir išmatuoja spektrinę absorbcijos sugebėjimą (570-650 nm). Spektrinę absorbcinį sugebėjimą atideda priklausomai nuo įvairaus pridėto supernatanto COS praskiedimo lygio.

7.1.2. LĄSTELIŲ PC12 BIOLOGINĖ ANALIZĖ

Supernatantus ląstelių COS-M5 iš transfekuočių ląstelių surenka analizei, praėjus 48 valandoms po transfekcijos, panaudodami ląstelių PC12 diferenciaciją. Ląsteles PC12 pasėja į 24-įdubimų indelius (Costar) su tankiu 1×10^5 ląstelių į įdubimą. Ląsteles PC12 kultivuoja RPMI 1640 su 6% veršiuko gemaliniu serumu ir 6% arkliniu serumu. Supernatantus COS prideda į ląstelių PC12 kultūrą (bendras tūris 1 ml) su įvairiais praskiedimais nuo 1:5 iki 1:500. Neuritinę išauga skaičiuoja arba kaip + (dauguma ląstelių, ekspresuojančių neuritus), arba kaip - (labai mažai, jeigu tikrai yra, ląstelių, ekspresuojančių neuritus).

7.2. REZULTATAI IR APTARIMAS

7.2.1. EKSPLANTATŲ ANALIZĖ IR ASOCIJUOTŲ LĄSTELIŲ KULTŪROS

Analizes in vitro, panaudojus viščiukų periferinių mazgų eksplantatus naudoja, kad nustatytų NGF ir BDNF biologinio aktyvumo skirtumus. Tuo metu kai abu faktoriai veikia į sensorinių neuronų, aptiktų dorsaliųjų šaknelių mazguose (DRG), populiacijas, kilusių iš nervinio volelio, tikrai BDNF palaiko mazginio ganglijaus plakodinės kilmės (NG) sensorinius neuronus. Priešingai, NGF, o ne BDNF, gali palaikyti išgyvenimą ir augimą paravertebralinės grandies simpatinių ganglijų (SG) neuronų. Išradimo pareiškėjas naudoja šias ganglijų analizes in vitro kad nustatytų, kaip chimerinės konstrukcijos ekspresuoja BDNF, NGF ar aktyvumus NGF ir BDNF. Išbando chimerų R7, R8, R9, R10, BM1 ir NM1 neurotrofinį aktyvumą dorsalinės šaknelės ganglijuje, mazginiame ganglijuje arba simpatiniame ganglijuje, panaudojus eksplantatų analizes. Kaip pastebėta aukščiau, abu, NGF ir BDNF, skatina neuritinę išaugą iš viščiuko E8 dorsalinės šaknelės ganglijaus (DRG). Tikrai BDNF ekspresuoja aktyvumą neuritinei išaugai, kas nustatyta tyrimuose su mazginiu gangliju (NG), o NGF, ne BDNF, ekspresuoja aktyvumą, nustatyta, panaudojus simpatinį ganglijų (SG; 6 Lentelė).

Chimera R8 BDNF/NGF skatina neuritinę išaugą iš DRG ir SG, o tai yra NGF-tipo bioaktyvumo rodiklis. Iš chimerių, žymėtų epitopu iš 10 amino rūgščių c-myc proto-onkogeno, BM1 ekspresuoja aktyvumą SG, charakteringą NGF-tipo aktyvumui, tada kai NM1 ekspresuoja tokį patį aktyvumą NG, charakteringą BDNF-tipo aktyvumui (6 Lentelė).

6 LENTELĖ

Palyginimas chimerių BDNF, NGF, BDNF/NGF ir myc-žymėto neurotrofinio faktoriaus, analizuojant eksplantuotą embrioninį viščiuko dorsalinės šaknelės ganglijų (DRG), mazginį ganglijų (NG) ir simpatinį ganglijų (SG).

Chimeros	DRG	NG	SG
R7 (250 mkl)	3	1	0
R8 (250 mkl)	3-4	2	3
R9 (250 mkl)	2-3	2	0
R10 (250 mkl)	3-4	2	0
NGF	5	1	5
BDNF	3	2	0.5
pCDM8 kontrolė (250 mkl)	0-1	0.5	0.5
BM1 (250 mkl)	2-3	2	1-2
NM1 (100 mkl)	5	3	5

Reikšmės atspindi neuritinės išaugos laipsnį ir dendritinį išsišakojimą, kur 5 reiškia maksimalią reikšmę ir 0 reiškia, kad nėra neuritinės išaugos. Reikšmės gautos trijuose savarankiškuose eksperimentuose. Neuritinę išaugą skaičiuoja po 24-48 valandų, pridėjus neurotrofinio faktoriaus. 8 Lentelėje priklausomybės "dozė - efektas" tyrimas rodo, kad neuritinės išaugos indukcijos atžvilgiu NM1 turi aktyvumą, palyginamą su aktyvumu NGF dorsalinės šaknelės ganglijuje ir simpatiniuose ganglijuose, tačiau yra aktyvesni mazginio ganglijaus analizėse. Atžvilgiu myc-žymėto NGF 7 Lentelė rodo, kad NM1 išlaisvina maždaug 63% dorsalinės šaknelės ganglijų neuronų prie koncentracijos 50 mkl, tada kai NGF išlaisvina tikrai maždaug 47%, kas rodo, kad NM1 atžvilgiu neuronų išgyvenimo gali funkcionuoti kaip NGF agonistas. 6 Pav. rodo kolorimetrinės analizės rezultata, panaudojus MTT neuronams DRG ir SG, paveiktiems su BDNF, NGF arba BM1. Kaip parodyta 6 Pav., BM1 aktyvumas skatina išgyvenimą žymiai labiau, negu aktyvumas BDNF, atžvilgiu DRG ir SG. Analogiškai NGF, aktyvumas DRG ir SG nesititruoja netgi praskiedus 1:1000 supernatantą COS BM1. Tokiu būdu 3'-myc žymėtos molekulės BDNF turi aktyvumą SG.

7 LENTELĖ

Aktyvumo NGF ir NM1 palyginimas, analizuojant išgyvenimą disocijuotų neuronų DRG iš viščiukų E8 embrionų

Neuronų DRG kiekis		
NGF	5 mkl	336
	20 mkl	440
	50 mkl	408
NM1	5 mkl	344
	20 mkl	446

50 mkl

542

Suskaičiuotas DRG neuronų kiekis atitinka 3.6% bendro ploto ir yra vidurkinis rezultatas iš dviejų indelių. COS NGF išlaisvina maždaug 47% DRG neuronų prie koncentracijos 50 mkl; esant ekvivalentiniam tūriui NM1 išlaisvina maždaug 63% neuronų.

8 LENTELE

Aktyvumo NGF ir NM1 palyginimas, analizuojant eksplantatus DRG, NG ir SCG viščiukų E8 embrionų

		DRG	NG	SCG
NG1	5 mkl	1	2	2
	10 mkl	4	0.5-1	2-3
	20 mkl	4-5	0.5-1	3-4
	30 mkl	5+	1-2	4-5
	40 mkl	5+	0	5+
	60 mkl	5+ ²	0	5+ ²
NM1	5 mkl	1-2	1-2	0-0.5
	10 mkl	2	2-3	0.5-1
	20 mkl	3-4	3-4	2-3
	30 mkl	4-5	4-5	5
	40 mkl	5+	5+	5+
	60 mkl	5+ ²	5+ ³	5+ ²

Pridėjus neurotrofinį faktorių po 24 valandų suskaičiuoja neuritinę išaugą.

7.2.2. PC12 BIOLOGINĖS PRABOS

Žiurkės ląstelės PC12, kaip parodyta, skiriasi tarpusavyje atsakais į visą eilę agentų, tame tarpe ir į nervinių ląstelių augimo faktorių. Diferencijuojantis atsakas, indukuotas nervinių ląstelių augimo faktoriaus, asocijuojasi su ląstelių proliferacija ir ilgų neuritinių ekstencijų išaugą. Todėl ši diferencialinė analizė tinka identifikuoti molekules su aktyvumu, artimu nervinių ląstelių augimo faktoriaus aktyvumui. Išradimo pareiškėjas ištyrė visas keturias chimerines konstrukcijas ir gamtinius BDNF ir NGF, jų sugebėjimą indukuoti ląstelių PC12 neuritinę išaugą.

Kaip parodyta 9 Lentelėje, NGF turi žymų neuritus skatinantį aktyvumą netgi praskiedus 1:250, NM1 taip pat aktyvus praskiedus 1:250. Chimera R8 (kuri ekspresuoja aktyvumą simpatinio ganglijo - žiūr. 1 Lentelėje.) sugeba indukuoti neuritinę išaugą PC12 ląstelių, esant praskiedimui 1:50. Nuostabu, kad analogiški rezultatai gauti ir su BM1, be to BM1 išreiškia neorotrofinį aktyvumą, kurio nėra giminingoje molekulėje BDNF. BDNF ekspresuoja tik nežymų aktyvumą neuritinės išaugos ląstelėse PC12, esant praskiedimui 1:5. COS-MOCK yra neaktyvus. Chimeros R1-R5 ir R7, R9 ir R10 taip pat nėra aktyvios. Tokiu būdu, audinių eksplantatų ir ląstelių PC12 analizėse aptikta, kad pridėjus negiminingas sekas prie C-galo molekulės BDNF ir NGF įgauna naują biologinį aktyvumą, kurio nėra tėvinėse molekulėse.

9 LENTELE

Biologinė analizė ląstelių PC12 su chimeromis

Chimeros	1:5	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500
COS-MOCK	-	-	-	-	-	-
BDNF	+/-	-	-	-	-	-
NGF	+	+	+	+	+	+
NM1	+	+	+	+	+	+
BM1	+	+	+	-	-	-
R8	+	+	+	-	-	-

Ląstės PC12 suskaičiuoja neuritinei išaugai 24-48 valandos po neurotrofinio faktoriaus pridėjimo.

8. PAVYZDYS: CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ NGF/BDNF KONSTRAVIMAS IR EKSPRESIJA

Konstruoja chimerinius neurotrofinius faktorius, kuriuose sritys NGF pakeistos atitinkamomis sritimis BDNF.

8.1. MEDŽIAGOS IR METODAI

8.1.1. CHIMERINIŲ MOLEKULIŲ KONSTRAVIMAS

Chimeras NGF/BDNF konstruoja trilaipėje polimerazės grandininėje reakcijoje (PCR), panaudojus keturis oligonukleotidus, kaip aprašyta Skyriuje 6.1.1.2, aukščiau. Kiekvienu atveju labiausiai nutolusiais praimeriais (atitinkamai A ir D 2 Pav. ir 7 Pav.) yra oligonukleotidai T7 ir T3 (Stratagen). 7 Pav. pateiktas strategijos vaizdas, naudojamos konstruojant chimeras, o 10 Lentelėje pateiktos sekos oligonukleotidinių praimerių, atitinkančių praimeriams B ir C 7 Pav. Nuoseklumas praimerio T3: 5'- ATTAACCCCTCA CTAAAG-3', o seka praimerio T7: 5'-AATACGAC TCACTATAG-3'. Trumpiau tariant, kDNR, koduojančią pelės beta-NGF, atpjauna jos pradiniuose saituose Smal ir Pst1 (Scott et al., 1983, Nature 302, 538) ir subklonuoja į restrikcinius saitus Smal/Pst1 plazmidės pKS (Stratagen). Gauta plazmidė KS-NGF tarnauja kaip templatė visoms tolimesnėms PCR-amplifikacijoms. Chimerines molekules konstruoja, amplifikuodami 5'-fragmentą, panaudodami praimerį T7 kartu su oligonukleotidiniu primeriu, apimančiu pageidautinas dalis NGF ir BDNF. 3'-fragmentą po to amplifikuoja panaudodami praimerį T7 ir antrą sukonstruotą praimerį NGF/BDNF. Du gautus fragmentus išskiria ir išvalo gelyje. Antroje stadijoje PCR-amplifikacijos 100-300 ng kiekvieno fragmento sujungia, sintezuoja ir amplifikuoja panaudodami primerius T7 ir T3. Visas reakcijas PCR atlieka prie tokių sąlygų. Denatūruoja 3 minutes prie temperatūros 94°C su tolesniais 25 ciklais denatūracijos/renatūracijos 1 minutę prie temperatūros 94°C, 2 minutes prie temperatūros 50°C ir 3 minutes prie temperatūros 72°C. Po to vykdo ekstenciją 10 minučių prie temperatūros 72°C. Rinkinį PCR Gene-Amp Kit (Cetus) naudoja pagal gamintojo nurodymą. Po to amplifikuotus fragmentus supjausto su pagalba ECO R1 ir SacIII ir subklonuoja į atitinkamus restrikcinius saitus modifikuoto ekspresuojančio vektoriaus pBJ-5, turinčio alfa-promotorių SR (8 Pav.; Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8:466). Tačiau chimeroje 1 NotI naudoja subklonavimui vietoje SacII, nes vidinis saitas SacII jau sukurtas. Visas chimeras sekvenuoja ribose pilnos amplifikacinės srities, panaudodami Sekvenazės protokolą (Stratagen).

10 LENTELE

Oligonukleotidiniai praimeriai, naudojami konstruojant chimeras CM1 - 12

CHIMERA S-1

Praimeris 1(B) NGF (Δ 3-9) ---> BDNF 1-7 (33-mer) GA TGA

5'-CGGGCGGGGTCCGAGTGGGATGAGCGCTTGCTC

Praimeris 2(C) (33-mer)

5'- CG GAC CCC GCC CGC CGC GGG GAG TTC TCA GTG T - 3'

CHIMERA S-2

Praimeris 3(B) NGF(Δ 10-22) - - -> BDNF 8-20 (37 mer)

5'- AAT GCT CTC GCA CAC GCT CAG CTC CCC CAT GTG GAA G - 3'

Praimeris 4(C) (39-mer)

5'- C GTG TGC GAC AGC ATT AGC GAG TGG GTT GGA GAT AAG AC-3'

CHIMERA S-3

Praimeris 5(B) NGF(Δ 23-33) - -.BDNF 21-33 (45 mer)

5'- C CAC TGC CGT CTT TTT ATC CGC CGC CGT AAC CCA CAC ACT GAC AC - 3'

Praimeris 6(C) (44 mer)

5'- T AAA AAG ACG GCA GTG GAC ATG TCG GGT AAG GAG GTG ACA GTG C - 3'

CHIMERA S-4

Praimeris 7(B) NGF (Δ 34-42) - -.BDNF (34-42) (38 mer)

5'- T TTC GAG GAC CGT GAC CGT GCC GCC CTT GAT GTC TGT G - 3'

Praimeris 8(C) (41 mer)

5'- GTC ACG GTC CTC GAA AAA GTC AAC ATT AAC AAC AGT GTA TT - 3'

CHIMERA S-5

Praimeris 9(B) NGF (Δ 43-50) - -.BDNF (43-50) (30 mer)

5'- GCC TTT CGA GAC GGG CAC CTC GGC CAG CAC - 3'

Praimeris 10(C) (42 mer)

5'- CCC GTC TCG AAA CGC CAA CTG AAG CAG TAC TTT TTT GAG ACC - 3'

CHIMERA S-6 (21-mers)

Praimeris B NGFTYR-54A:

5'-CAG TAC TTT TAT GAG ACC AAG -3'

Praimeris C NGFTYR-54B:

5'-CTT GGT CTC ATA AAA GTA CTG -3'

CHIMERA S-7

Praimeris 11(B) (38-mer)

5'- TT TGT GTA CCC CAT AGG ATT GCA CTT GGT CTC AAA AAA - 3'

Praimeris 12(C) (35-mer)

5'- CCT ATG GGG TAC ACA AAG GAG GGG TGC CGG GGC AT - 3'

CHIMERA S-8

Praimeris 13(B) (33-mer)

5'- GGA GTT CCA GTG CCT CTT GTC GAT GCC CCG GC - 3'

Praimeris 14(C) (35-mer)

5'- AGG CAC TGG AAC TCC CAG TGC ACC ACT ACT CAC A - 3'

CHIMERA S-9

Praimeris 15(B) (37-mer)

5'- AC ATA CGA CTG GGT AGT TCG GCA GTA TGA GTT CCA GT - 3'

Praimeris 16(C) (37-mer)

5'- ACT ACC CAG TCG TAT GTG CGG GCG TTG ACA ACA GAT G - 3'

CHIMERA S-10

Praimeris 17(B) (36-mer)

5'- AT TCG TTT TTT GCT ATC CAT TGT CAA CGC CTT GAC G - 3'

Praimeris 18(C) (38-mer)

5'- TG GAT AGC AAA AAA CGA ATT GGC TGG AGG TTC CGG - 3'

CHIMERA S-11 (21-mers)

(B) NGFSER-108A: 5'- G ATA GAC ACT TCC TGT GTG TG - 3'

(C) NGFSER-108B: 5'- CA CAC ACA GGA AGT GTC TAT C - 3'

CHIMERA S-12

Praimeris 19(B) (37-mer)

5'- TCC CCT CTT AAT GGT CAA AGT ACA CAC ACA GGC TGT G - 3'

Praimeris 20(C) (36-mer)

5'- TG ACC ATT AAA AGG GGA AGA TGA CTT GCC TGC AGG A - 3' ****

8.1.2. CHIMERINIŲ NEUROTROFINIŲ FAKTORIŲ EKSPRESIJA COS LĄSTELĖSE

Ląsteles COS-7 transfekuoja chimerinėmis konstrukcijomis panaudodami metodą DEAE-Dekstran-Chlorochin. Trumpai sakant, ląstelių kultūras suskaldo vieną dieną prieš transfekciją, taip, kad būtų apie 750000 ląstelių į 60 mm indelį su kultūra. Gauna transfekcinį mišinį, turintį 5 mkl DNR (apie 5 mkg), 1 ml DMEM (be serumo) ir 25 mkl 20 mg/ml DEAE-Dekstrano. Kultivuotas ląsteles COS-7 po to perplauna trys kartus 5 ml beseruminėje terpėje DMEM. Prideda transfekacinį mišinį (aukščiau) ir inkubuoja 30 minučių prie temperatūros 37°C. Po to 2 ml beseruminės terpės DMEM apjungia su 20 mkl 8 ml chlorochino ir prideda tiesiai į mišinį ląstelių COS-7/DNR/DEAE-Dekstrano, kurį po to inkubuoja 2.5 valandos prie temperatūros 37°C. Po to supernatantą nusiurbia iš ląstelių ir pakeičia 2 ml beserumine DMEM, turinčią 10% dimetilsulfooksido (DMSO). Po to ląsteles inkubuoja kambario temperatūroje 2 minutes 30 sekundžių, po to jas perplauna 5 ml DMEM, kurią nusiurbia ir pakeičia maždaug 2.5 ml šviežia DMEM plius 6% arklio serumo ir geležimi papildyta 6% veršiuko serumo. Po to analizuoja ląstelių chimerinių neurotrofinių faktorių ekspresiją per 48-72 valandas, kaip nurodyta žemiau.

8.2. REZULTATAI IR APTARIMAS

Gauna chimerines nukleiorūgštines molekules turinčias DNR dalis, koduojančias NGF, po to molekules pakeičia atitinkamomis sritimis BDNF su pastoviais intervalais. 11 Lentelėje pateikta

delecija NGF srities kartu su insercija atitinkamos srities BDNF kiekvienai chimera. Tenka pažymėti, kad S-6 ir S-11 neša tik taškinės mutacijas, kurias irgi gauna panaudojus trilaipę polimerazės-grandininę reakciją (PCR).

11 LENTELE

CHIMERA	NGF SRITIES DELECIA BDNF SRITIES INSERCIJA	
	Tre Met	His Arg
S-1	NGF (d 3-9 / BDNF 1-7)	
S-2	Gli Val	Gli Val
	NGF (d 10-22 / BDNF 8-20)	
S-3	Gli Gli	Tre Gli
	NGF (d 23-33 / BDNF 21-33)	
S-4	Liz Val	Gli Val
	NGF (d 34-42 / BDNF 34-42)	
S-5	Asn Arg	Pro Liz
	NGF (d 43-50 / BDNF 43-50)	
S-6	Glu Cis	Glu Cis
	NGF (d 51-58 / BDNF 51-58)	
S-7	Arg Cis	Asn Cis
	NGF (d 59-68 / BDNF 59-68)	
S-8	Arg Cis	Arg Cis
	NGF (d 69-80 / BDNF 69-80)	
S-9	Tre Tre	Arg Tre
	NGF (d 81-91 / BDNF 81-91)	
S-10	Tre Fen	Met Fen
	NGF (d 92-101 / BDNF 92-102)	
S-11	Ile Cis	Ile Cis
	NGF (d 102-110 / BDNF 103-111)	
S-12	Val Gli	Tre Arg
	NGF (d 111-120 / BDNF 112-119)	

BDNF sekos pakeitimo sritys pateiktos grafiškai 9 Pav., o aminorūgštinės sekos S1-12 pateikti 10 Pav. Reikia pažymėti, kad kiekviena iš S1-12 turi dalį sekos, koduojančios pelės NGF, ir dalį sekos, koduojančios žmogaus BDNF.

Chimerinius neurotrofinius faktorius S1-12 kiekvieną transfekuoja į ląsteles COS-7, panaudojus metodą DEAE-Dekstran-Chlorochin. Ekspresiją chimerinių neurotrofinių faktorių išmatuoja meta-

boliškai žymėdami su pagalba ^{35}S -metjonino su tolimesne elektroforeze poliakrilamidiniuose geliuose žymėto ląstelinio supernatanto ir autoradiografija. Duomenys pateikti 12 Lentelėje kaip procentinis kiekis atžvilgiu NGF laukinio tipo. Duomenis gauna palygindami autoradiogramų žymėtus intensyvumus, specifiskai nukreiptus į juostą subrendusio NGF dydžio maždaug 13 kDa (8B Pav.) ir po chimelių NGF laukinio tipo ir NGF/BDNF imunoprecipitacijos, panaudojus antikūnus NGF (8C Pav.).

9. PAVYZDYS: CHIMERINIŲ NEOROTROFINIŲ FAKTORIŲ S1-12 NEUROTROFINIS AKTYVUMAS

9.1. MEDŽIAGOS IR METODAI

Biologines analizes, panaudojus dorsalinės šaknelės ganglijų (DRG), simpatinių ganglijų (SG), mazginių ganglijų (NG) ir feochromocitomos PC12 ląstelių linijas dažniausiai vykdo taip, kaip aprašyta 7 Skyriuje, aukščiau.

9.2. REZULTATAI

NGF-aktyvumą chimelių S1-12 iš pradžių įvertina, panaudoję ląsteles PC12. Neuritinę išaugą PC12 panaudoja kaip aktyvumo NGF matą. Kiekvienos chimeros aktyvumą nustato atžvilgiu rekombinantinio laukinio tipo NGF (NGF-wt) aktyvumo, išreikšto transfektuotomis ląstelėmis COS-7, kurios laisvai gauna ekspresijos reikšmę lygią 100% (12 Lentelė). Specifinį aktyvumą kiekvienos chimeros nustato, įvertinę koncentraciją chimerinio neurotrofinio faktoriaus, panaudojus elektroforezę poliakrilamidiniuose geliuose su natrio dodecilsulfatu, atliekamos atžvilgiu metaboliškai žymėtų supernatantų ląstelių COS-7, vėl laisvai suteikdami reikšmę 100% neurotrofiniam aktyvumui, asocijuotam su ląstelėmis COS-7, transfektuotomis NGF - wt.

Eksplantatinės kultūros dorsalinės šaknelės ganglijaus (DRG), mazginio ganglijaus (NG) ir simpatinio ganglijaus (SG), gautos iš viščiukų E8 embrionų, po to veikiamos lygių kiekių S1-12, NGF-wt ir vektoriaus (neigiamas kontrolės pavyzdys), transfektuotų supernatantais ląstelių COS-7. Po 24 valandų nustato kultūroje skaidulų išaugą kaip atsaką į NGF rekombinantinio laukinio tipo, vektorinį negatyvų kontrolinį pavyzdį arba chimeras S1-12 (12 Lentelė) laisvoje skalėje nuo 0 iki 5 palygindami su standartinių fotografijų rinkiniu, paimtu remiantis standartinėmis reakcijomis į dozes nuo DRG iki NGF viščiukų E8 embriono, esant dozavimo lygiui nuo 0 iki 20 ng/ml. Dydis 0 rodo, kad nėra atsako; dydis 1 rodo pastebimą aktyvumą su išauga apie 10-50 skaidulų (ekvivalentiškai įprastam atsakui nuo 20 iki 100 pikogramas/ml NGF); dydis 2 rodo vidutinį aktyvumą su išauga daugelio skaidulų su akivaizdžiu halo; dydis 3 rodo gerą aktyvumą su išauga daugelio ilgų skaidulų; dydis 4 rodo stiprų aktyvumą su gausia skaidulų išauga ir dydis 5 rodo masyvių skaidulų augimą, kas ekvivalentiška maksimaliam atsakui pradiniam NGF lygyje (apie 1-10 nanogramas/ml). Rezultatai eksplantatų 12 Lentelėje rodo maksimalią skaidulų išaugą, pastebimą prie pradinių lygių kiekvieno supernatanto, nustatytą priklausomybės dozė-efektas analizėje. Supernatantus analizuoja diapazono ribose nuo 0.1 iki 83 mkl prie galinio tūrio 2 ml. Kituose tyrimuose eksplantatų aukštesnės koncentracijos S4 asocijuojasi su aukštesnėmis išaugos reikšmėmis.

12 LENTELĖ

Sąrašas įjungtų supernatantų:

Klonai	Santykinės ekspresijos lygis	Specifinis aktyvumas atžvilgiu ląstelių PC12	Eksplantatų* duomenys		
			DRG	NG	SG
NGF -wt	100%	100%	5	1	5

Vektorius	---	---	0	0	0
S-1	200%	25%	5	1	5
S-2	100%	100%	5	2	5
S-3	100%	100%	5	3	5
S-4	20%	100%	1	1	1
S-5	5%	100%	1	1	1
S-6	100%	100%	5	3	5
S-7	50%	100%	5	2	5
S-8	100%	100%	5	2	5
S-9	100%	100%	5	4	5
S-10	100%	100%	5	4	5
S-11	50%	50%	5	1	5
S-12	100%	50%	5	3	5

* skaidulų išauga per 24 valandas

9.3. APTARIMAS

Netikėta, bet iš duomenų sektų, kad nežiūrint pakeitimo NGF sričių BDNF seka, dauguma chimery NGF-BDNF išlaiko pilną aktyvumą ląstelių, atsakingų už NGF. Įvairūs kiekiai daugumos chimerinių neurotrofinių faktorių rodo aukštus aktyvumo lygius, skatinančius neuritinę išaugą, PC12 ląstelėms, kurie lygintini su aktyvumu NGF laukinio tipo. Ten, kur yra išimtys, S-1, matyt, pastebimai mažiau aktyvus, negu NGF laukinio tipo, o chimeros S-11 ir S-12 išreiškia apie 50% NGF specifinio aktyvumo. Tačiau, išlaikymas pilno aktyvumo NGF, daugumai chimery yra nelauktas, iš pradžių laukta, kad kai kurie mažiau svarbūs pakitimai kritinėse srityse NGF seka gali duoti žymų aktyvumo netekimą.

Be to, nustatyta, kad dauguma chimerinių neurotrofinių faktorių iš čia tirtų, kaip pavyzdžiui NGF, indukuoja maksimalų atsaką dorsalinės šaknelės ganglijuje ir simpatiniame ganglijuje kaip jų eksplantatai. Kaip parodyta 12 Lentelėje, faktiškai visos išmėgintos chimeros rodo maksimalų aktyvumą atžvilgiu dorsalinės šaknelės ganglijų ir simpatinių ganglijų. Pastebėta, kad chimera S-12 turi specifinį aktyvumą 3-5 kartus didesnį, negu NGF dorsalinės šaknelės ganglijų eksplantatuose, tai rodo, kad S-12 gali būti "superagonistu" NGF aktyvumo, bent jau kai kurioms taikinio ląstelėms. Galimas paaiškinimas S-12 aktyvumo kaip superagonisto, gali būti tame, kad pakeitimas BDNF sekos gali sukelti konformacinius pakitimus struktūroje NGF, kas duos aktyvumo S-12 padidėjimą receptoriui NGF, arba, alternatyviai, padidintą stabilumą S-12 irimo procesams. Be to, dauguma chimery rodo papildomą aktyvumą atžvilgiu ganglijaus, paprastai atsakingo už BDNF daugiau, negu už NGF. NGF palaiko išgyvenimą ir neuritinę išaugą iš viščiukų embrionų dorsalinės šaknelės ganglijaus sensorinių neuronų ir simpatinės grandinės paravertebraliųjų ganglijų eksplantatų kultūrų, tačiau nerodo žymaus poveikio į eksplantatus sensorinių neuronų mazginio ganglijaus, turinčio plakodinę prigimtį (Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319). Priešingai, BDNF palaiko išgyvenimą ir neuritinę išaugą iš eksplantatų dorsalinės šaknelės ganglijaus ir eksplantatų mazginio ganglijaus, tačiau nerodo jokie poveikio į simpatinius ganglijus. Kaip parodyta 12 Lentelėje, dauguma rūšių iš chimerinių neurotrofinių faktorių NGF-BDNF indukuoja skaidulų išaugą mazginio ganglijaus eksplantatams nuo vidutinės iki stiprios, kas charakteringa BDNF-tipo aktyvumui. Chimeros 3, 4, 6, 9, 10 ir 12, visos rodo mazginių ganglijų aktyvumą, kuris žymiai viršija bet kurį efektą, stebėtą atžvilgiu NGF. Todėl atrodo, kad visa eilė sekų modifikacijų, pradedant nuo amino galo iki karboksilo galo NGF, gali duoti BDNF-tipo aktyvumą arba aktyvumą kitų neurotrofinių šeimos narių.

10. MIKROORGANIZMŲ DEPONAVIMAS

Tokios kDNR yra deponuotos Amerikos Tipinių Kultūrų Kolekcijoje (ATCC), Rokvile, Merilende:

Chimerinių molekulių pavadinimas	Sutrumpinimas	Depozito Nr.
pBJ51mN/hB-S4	S4	40859
pBJ51mN/hB-S9	S9	40861
pBJ51mN/hB-S10	S10	40858
pBJ51mN/hB-S12	S12	40860
pC8hB/hN-R8	R8	40862
pC8hmN/myc-NM1	NM1	40864
pC8hB/myc-BM1	BM1	40863

Šis išradimas neturi būti ribojamas čia aprašytų specifinių varijantų apimties. Iš tikro, įvairios išradimo modifikacijos, be aprašytų čia, pasidarys aiškos šios srities technikos specialistui, kai jis peržiūrės aprašymą ir pateiktus brėžinius. Tokios modifikacijos krenta į pateiktos išradimo formulės apimtį.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis neurotrofinį aktyvumą ir turintis (I) bent jau dalį ląstelinio faktoriaus ir (II) bent jau dalį kito peptido.
2. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelinis faktorius yra neurotrofinis faktorius.
3. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelinis faktorius yra nervinių ląstelių augimo faktorius.
4. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelinis faktorius yra neurotrofinis faktorius smegeninės kilmės.
5. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelinis faktorius yra neurotrofinas-3.
6. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelinis faktorius yra ciliarinis neurotrofinis faktorius.
7. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra ląstelinis faktorius.
8. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra neurotrofinis faktorius.
9. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra nervinių ląstelių augimo faktorius.
10. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra neurotrofinis faktorius smegeninės kilmės.
11. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra neurotrofinas-3.
12. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra ląstelinis neurotrofinis faktorius.
13. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra antigeninis peptidas.
14. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra dalis myc-baltymo.
15. Faktorius pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad peptidas yra peptidas, turintis seką GLU-GLN-LIZ-LEU-ILE-SER-GLU-GLU-ASP-LEU.
16. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad ląstelinis faktorius yra neurotrofinis faktorius, kuris yra neurotrofinų genų šeimos narys.
17. Faktorius pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad turi izoelektrinį tašką (pI) apie 9-10.
18. Faktorius pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad įjungia keturias cisteino liekanas, išsidėsčiusias tokiose keturiuose chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštinės sekos padėtyse: maždaug prie amino rūgšties 14, maždaug prie amino rūgšties 57, maždaug prie amino rūgšties 67, maždaug prie amino rūgšties 79, maždaug prie amino rūgšties 108 ir maždaug prie amino rūgšties 110, arba analogiškose padėtyse atžvilgiu insercijų arba delecijų homologinėje sekoje, kuri būdinga neurotrofinų šeimos nariams.
19. Faktorius pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad įjungia penkias cisteino liekanas, išsidėsčiusias tokiose penkiose chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštinės sekos padėtyse: maždaug prie amino rūgšties 14, maždaug prie amino rūgšties 57, maždaug prie amino rūgšties 67, maždaug prie amino rūgšties 79, maždaug prie amino rūgšties 108 ir maždaug prie amino rūgšties 110, arba analogiškose padėtyse atžvilgiu insercijų arba delecijų homologinėje sekoje, kuri būdinga neurotrofinų šeimos nariams.
20. Faktorius pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad įjungia šešias cisteino liekanas, išsidėsčiusias tokiose šešiose chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštinės sekos padėtyse: maždaug prie amino rūgšties 14, maždaug prie amino rūgšties 57, maždaug prie amino rūgšties 67, maždaug prie amino rūgšties 79, maždaug prie amino rūgšties 108 ir maždaug prie amino rūgšties 110, arba

analogiškose padėtyse atžvilgiu insercijų arba delecijų homologinėje sekoje, kuri būdinga neurotrofinų šeimos nariams.

21. Faktorius pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad įjungia keturias cisteino liekanas, išsidėsčiusias tokiose keturiuose chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštinės sekos padėtyse: maždaug prie amino rūgšties 14, maždaug prie amino rūgšties 57, maždaug prie amino rūgšties 67, maždaug prie amino rūgšties 79, maždaug prie amino rūgšties 108 ir maždaug prie amino rūgšties 110, arba analogiškose padėtyse atžvilgiu insercijų arba delecijų homologinėje sekoje, kuri būdinga neurotrofinų šeimos nariams.

22. Faktorius pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad įjungia penkias cisteino liekanas, išsidėsčiusias tokiose penkiose chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštinės sekos padėtyse: maždaug prie amino rūgšties 14, maždaug prie amino rūgšties 57, maždaug prie amino rūgšties 67, maždaug prie amino rūgšties 79, maždaug prie amino rūgšties 108 ir maždaug prie amino rūgšties 110, arba analogiškose padėtyse atžvilgiu insercijų arba delecijų homologinėje sekoje, kuri būdinga neurotrofinų šeimos nariams.

23. Faktorius pagal 17 punktą, besiskiriantis tuo, kad įjungia šešias cisteino liekanas, išsidėsčiusias tokiose šešiose chimerinio neurotrofinio faktoriaus aminorūgštinės sekos padėtyse: maždaug prie amino rūgšties 14, maždaug prie amino rūgšties 57, maždaug prie amino rūgšties 67, maždaug prie amino rūgšties 79, maždaug prie amino rūgšties 108 ir maždaug prie amino rūgšties 110, arba analogiškose padėtyse atžvilgiu insercijų arba delecijų homologinėje sekoje, kuri būdinga neurotrofinų šeimos nariams.

24. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S1, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S1 10 Pav.

25. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S2, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S2 10 Pav.

26. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S3, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S3 10 Pav.

27. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S4, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40859, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S4 10 Pav.

28. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S5, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S5 10 Pav.

29. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S6, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S6 10 Pav.

30. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S7, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S7 10 Pav.

31. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S8, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimeraui S8 10 Pav.

32. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S9, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40861, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera S9 10 Pav.

33. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S10, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40858, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera S10 10 Pav.

34. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S11, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera S11 10 Pav.

35. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pBJ51mN/hB-S12, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40860, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera S12 10 Pav.

36. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R1, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R1 5 Pav.

37. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R2, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R2 5 Pav.

38. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R3, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R3 5 Pav.

39. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R4, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R4 5 Pav.

40. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R5, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R5 5 Pav.

41. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R6, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R6 5 Pav.

42. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R7, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R7 5 Pav.

43. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R8, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40862, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R8 5 Pav.

44. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R9, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R9 5 Pav.

45. Faktorius pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/hN-R10, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra chimerinis neurotrofinis faktorius, turintis aminorūgštinę seką, iš esmės pateiktą chimera R10 5 Pav.

46. Faktorius pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hmN/myc-NM1, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40864, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra NM1 5 Pav.

47. Faktorių pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad koduojasi plazmide pC8hB/myc-BM1, kuri yra deponuota ATCC su depozito numeriu 40863, arba jo funkcinis ekvivalentas, kuris yra BM1 5 Pav.

48. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad jos sudėtyje yra chimerinis neurotrofinis faktorius, kuris turi neurotrofinį aktyvumą ir įjungia (I) bent dalį ląstelinio faktoriaus ir (II) bent dalį kito peptido.

49. Farmacinė kompozicija pagal 48 punktą, besiskirianti tuo, kad ląstelinis faktorius yra neurotrofinis faktorius.

50. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad savo sudėtyje turi chimerinį neurotrofinį faktorių pagal punktus 16, 17 arba 18.

51. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 1 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

52. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 2 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

53. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 3 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

54. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 4 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

55. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 5 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

56. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 6 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

57. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 7 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

58. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 8 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

59. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 9 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

60. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 10 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

61. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 11 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

62. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 12 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

63. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 13 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

64. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 14 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

65. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 15 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

66. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 16 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

67. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 17 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

68. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 18 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

69. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 19 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
70. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 20 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
71. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 21 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
72. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 22 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
73. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 23 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
74. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 24 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
75. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 25 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
76. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 26 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
77. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 27 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
78. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 28 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
79. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 29 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
80. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 30 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
81. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 31 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
82. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 32 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
83. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 33 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
84. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 34 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
85. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 35 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
86. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 36 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
87. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 37 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
88. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 38 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
89. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 39 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
90. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 40 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.
91. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 41 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

92. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 42 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

93. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 43 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

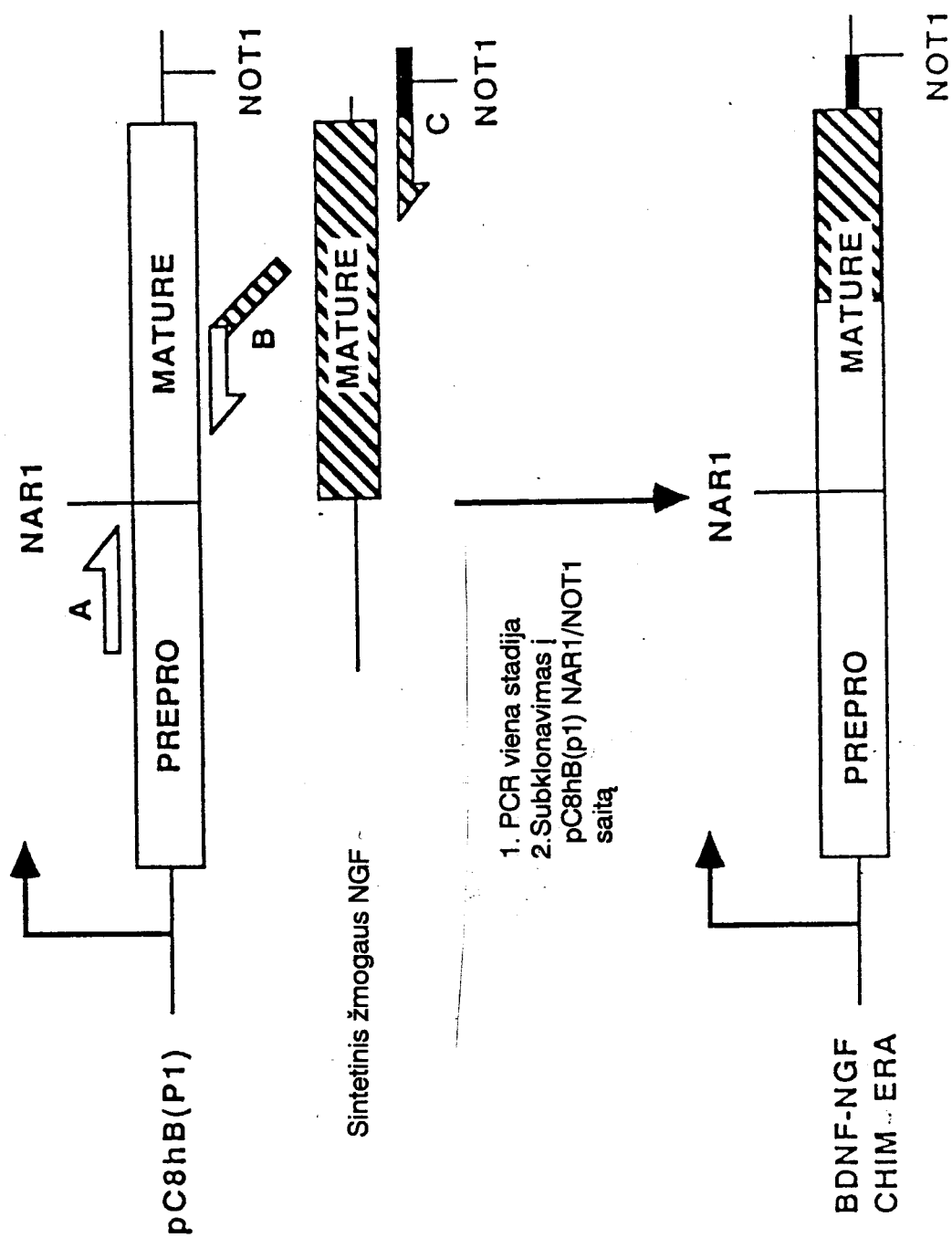
94. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 44 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

95. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 45 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

96. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 46 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

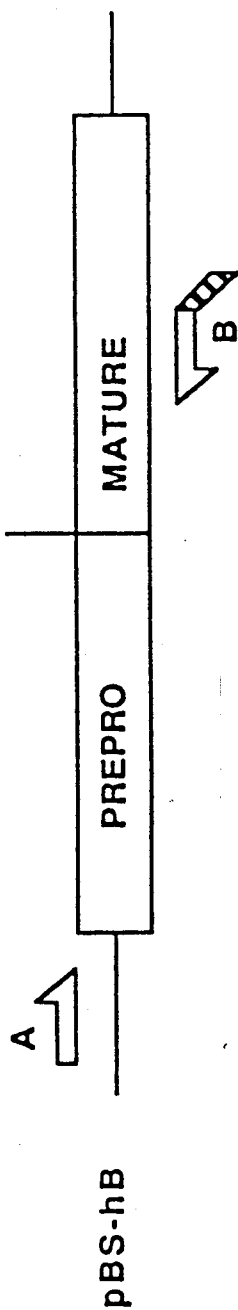
97. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 47 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.

98. Nukleininės rūgšties molekulė, koduojanti chimerinį neurotrofinį faktorių pagal 48 punktą arba jo funkcinį ekvivalentą.



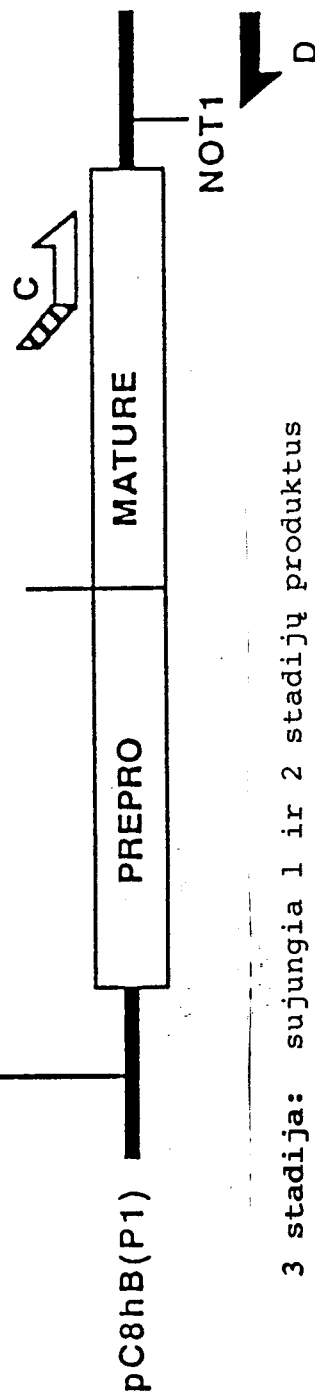
1 stadija: PCR su A ir B pradmenimis

NAR1



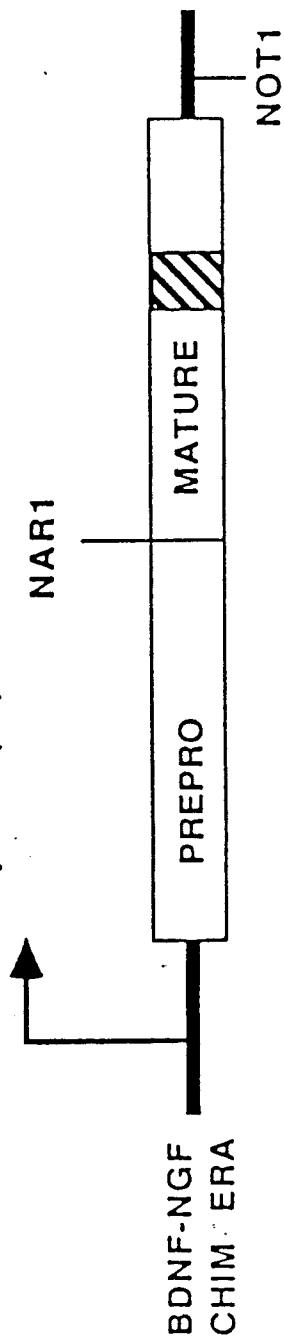
2 stadija: PCR su C ir D pradmenimis

NAR1

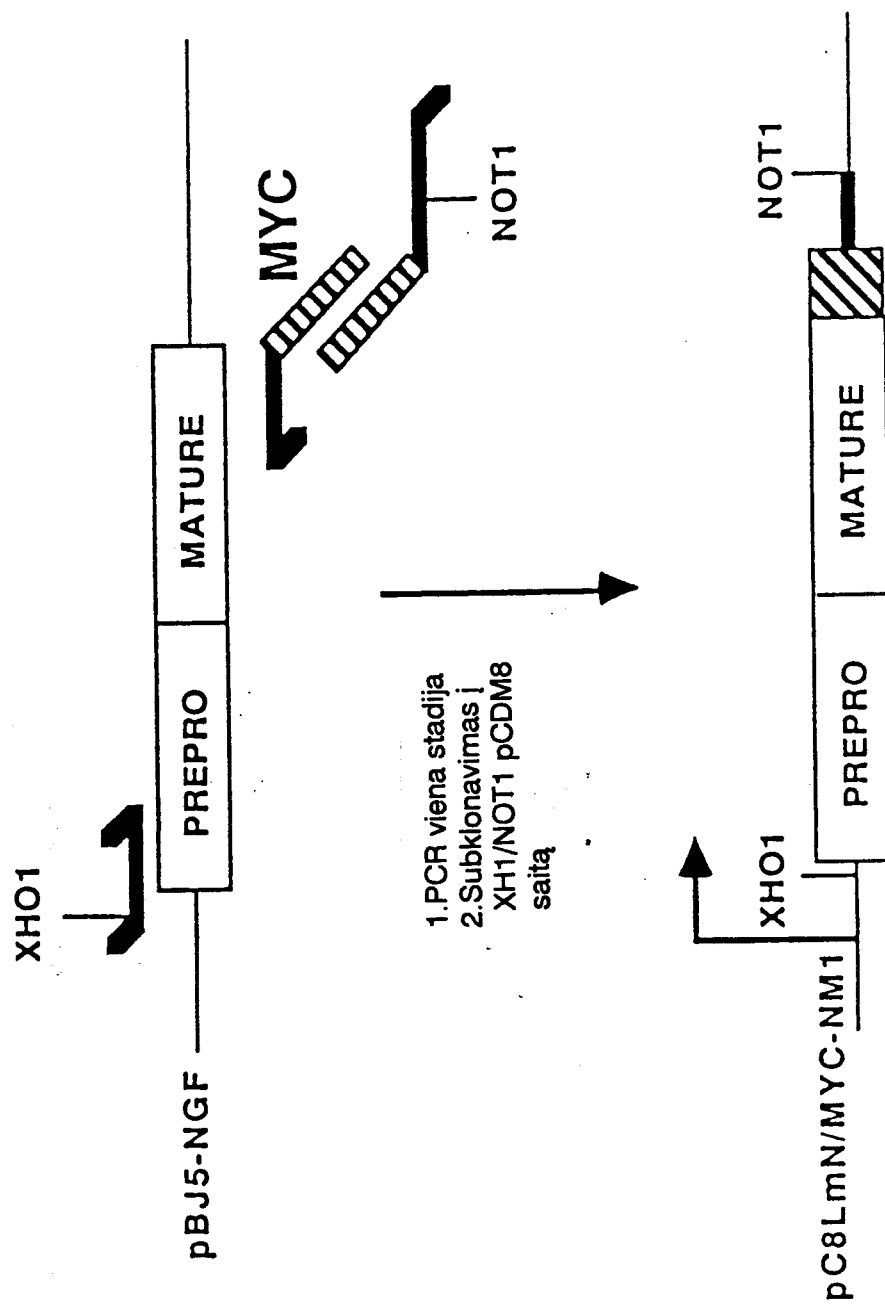


3 stadija: sujungia 1 ir 2 stadijų produktus

- amplifikuoja su A ir D pradmenimis
- sukarpo su NAR1/NOT1 ir subklonuoja į atitinkamus pC8hB(Pl) saitus

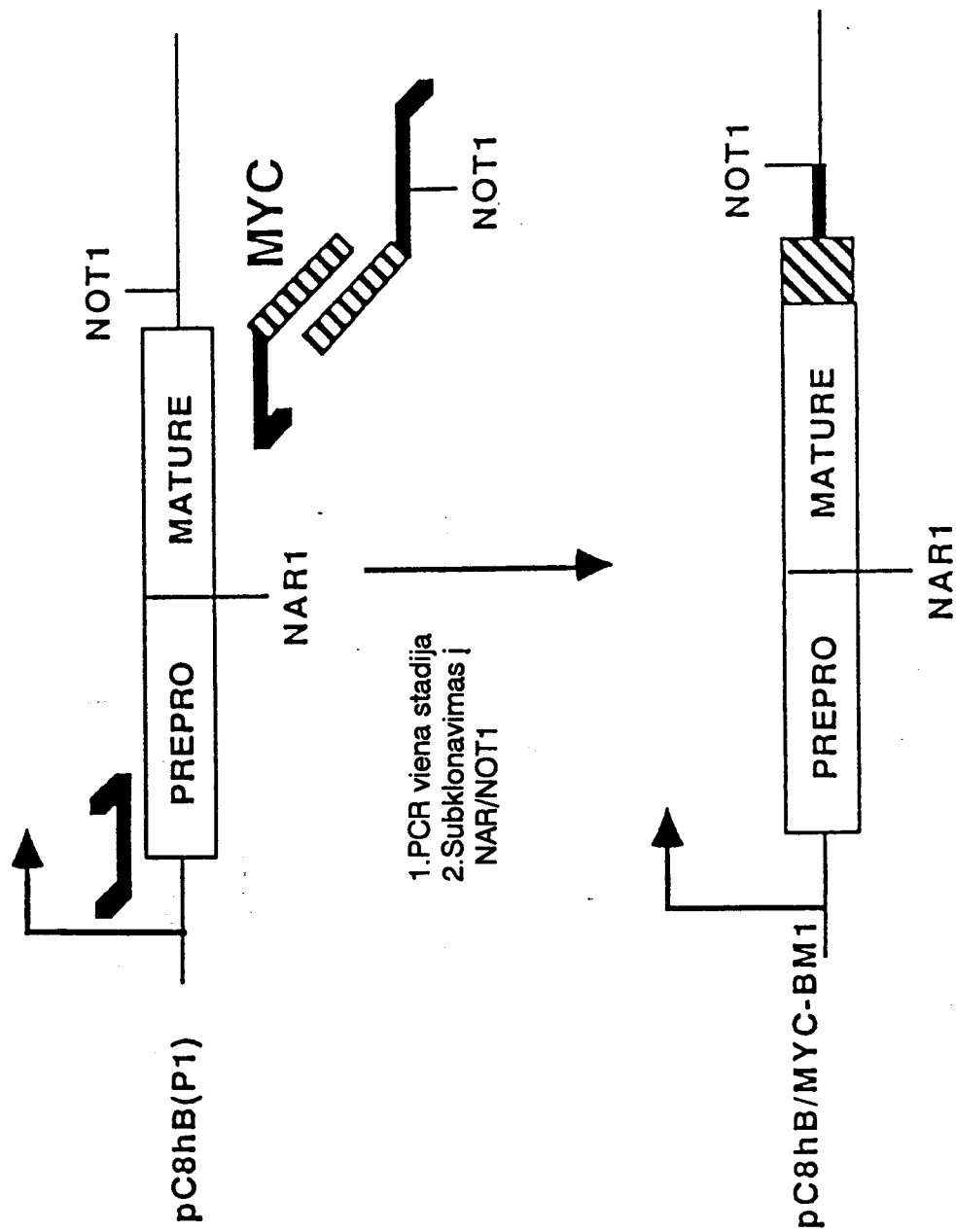


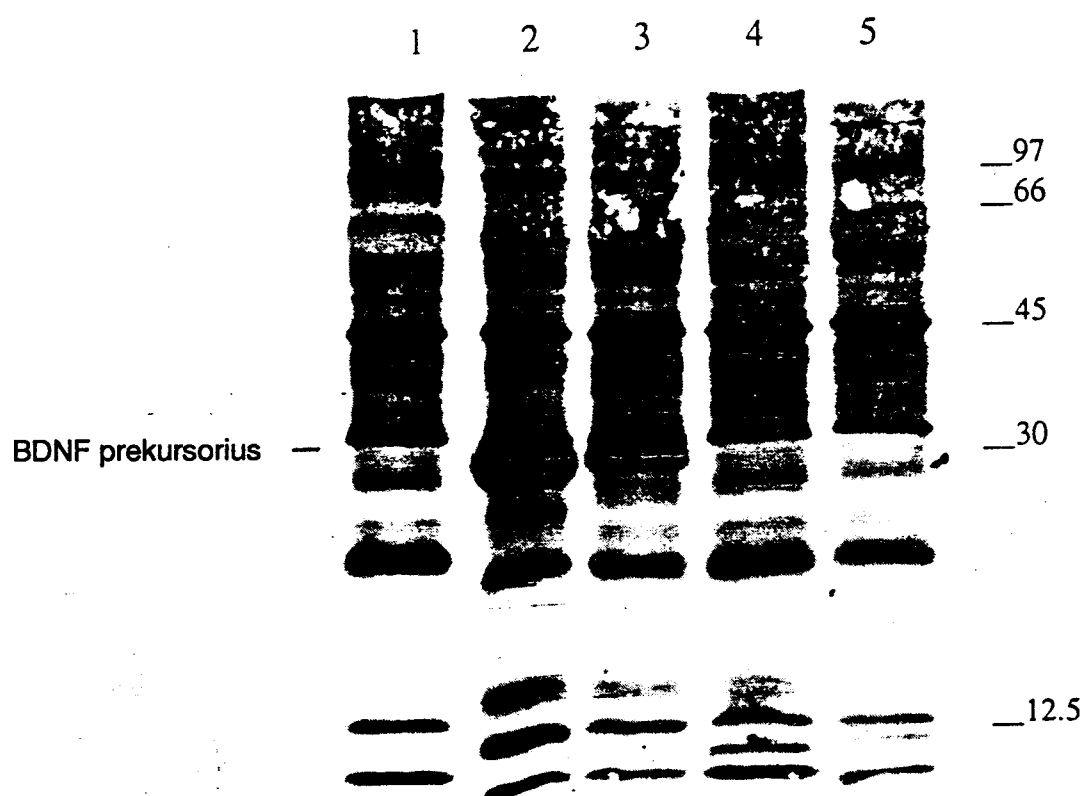
2 pav.



1. PCR viena stadija
2. Subklonavimas į
XH1/NOT1 pCDM8
saitą

3A pav.





4 PAV.

Skaldymas		10	20	30	40	50	60
<<PREPRO V MATURE>>*			*	*	*	*	*
ŽMOGAUS NGF	RSKR	SSsHPiFhG	EFSVCDSVS	WV--GDKTTATD	IKGKEVmvLG	EVNINNSVFK	QYFFETKCRd
ŽIURKĖS NGF	RSKR	SSTHPVFHMG	EFSVCDSVS	WV--GDKTTATD	IKGKEVTVLG	EVNINNSVFK	QYFFETKCRd
PELĖS NGF	RSKR	SSTHPVFHMG	EFSVCDSVS	WV--GDKTTATD	IKGKEVTVLa	EVNINNSVFK	QYFFETKCRd
ŽMOGAUS BDNF	RVRR	HS-DPA-RRG	ELSVCDISE	WVTAADKKTAVD	MSGGTVTVLE	KVPVSKGQLK	QYFYETKCNP
R1							
ŽMOGAUS BDNF	RVRR						
ŽMOGAUS NGF		SSsHPiFhG	EFSVCDSVS	WV--GDKTTATD	IKGKEVmvLG	EVNINNSVFK	QYFFETKCRd
R2							
ŽMOGAUS BDNF	RVRR	HS-DPA-RRG	ELSVCD				
ŽMOGAUS NGF			VSV	WV--GDKTTATD	IKGKEVmvLG	EVNINNSVFK	QYFFETKCRd
R3							
ŽMOGAUS BDNF	RVRR	HS-DPA-RRG	ELSVCDISE	WVTAADKKTAVD	MSGGTVTVLE	KVPVSKGQLK	QYFYETKCRd
ŽMOGAUS NGF							
R4							
ŽMOGAUS BDNF	RVRR	HS-DPA-RRG	ELSVCDISE	WVTAADKKTAVD	MSGGTVTVLE	KVPVSKGQLK	QYFYETKCNP
ŽMOGAUS NGF							
R5							
ŽMOGAUS BDNF	RVRR	HS-DPA-RRG	ELSVCDISE	WVTAADKKTAVD	MSGGTVTVLE	KVPVSKGQLK	QYFYETKCNP
ŽMOGAUS NGF							

tesinys 58pav.

215

	70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*	*
PNPVDSGCRG	IDSKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TMDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa	
PNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TTDDKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAARRG	
SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TTDeKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKACRRG	
MGYTKEGCRG	IDKRHWNSQC	RTTQSYVRAL	TMSKKRIGWR	FIRIDTSCVC	TLTIKRGR	
PNPVDSGCRG	IDSKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TMDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa	
PNPVDSGCRG	IDSKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TMDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa	
PNPVDSGCRG	IDSKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TMDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa	
MGYTKEGCRG	ID	SKHWNSYC	TTTHTFVKAL	TMDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa
MGYTKEGCRG	IDKRHWNSQC	R	TTHTFVKAL	TMDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa

is 5A
pav.

5B PAV.

216

R6

ŽMOGAUS BDNF RARR HS-DPA-RRG ELSVCD SISE WVTAAADKKTA VD MSGGT VTVLE KVPVSKGQLK QYFYETKCNP
ŽMOGAUS NGF

R7

ŽMOGAUS BDNF RARR HS-DPA-RRG ELSVCD SISE WVTAAADKKTA VD MSG** * VPVSKGQLK QYFYETKCNP
PELĖS NGF KEVTVLa E

R8

ŽMOGAUS BDNF RARR HS-DPA-RRG ELSVCD SISE WVTAAADKKTA VD MSGGT VTVLE KVP***** QYFYETKCNP
PELĖS NGF INNSVFr

R9

ŽMOGAUS BDNF RARR HS-DPA-RRG ELSVCD SISE WVTAAADKKTA VD MSGGT VTVLE KVPVSKGQLK QYFYETKC**
PELĖS NGF RA

R10

ŽMOGAUS BDNF RARR HS-DPA-RRG ELSVCD SISE WVTAAADKKTA VD MSGGT VTVLE KVPVSKGQLK QYFYETKCNP
PELĖS NGF

BM1

ŽMOGAUS BDNF RARR HS-DPA-RRG ELSVCD SISE WVTAAADKKTA VD MSGGT VTVLE KVPVSKGQLK QYFYETKCNP
MYC EPITOPAS

NM1

PELĖS NGF RSKR SSTHPVFHMG EFSVCD SVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLa EVNINNSVFr QYFFETKCRA
MYC EPITOPAS

BM3

BM1

PELĖS NGF RSKR SSTHPVFHMG EFSVCD SVSV WV--GDKTTATD CDSISE WVTAAADKKTA VD MSGGT VTVLE KVPVSKGQLK QYFYETKCNP

5C pav.

Tęsinys 5D pav.

217

MGYTKEGCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC
 VLSRKAVRRa

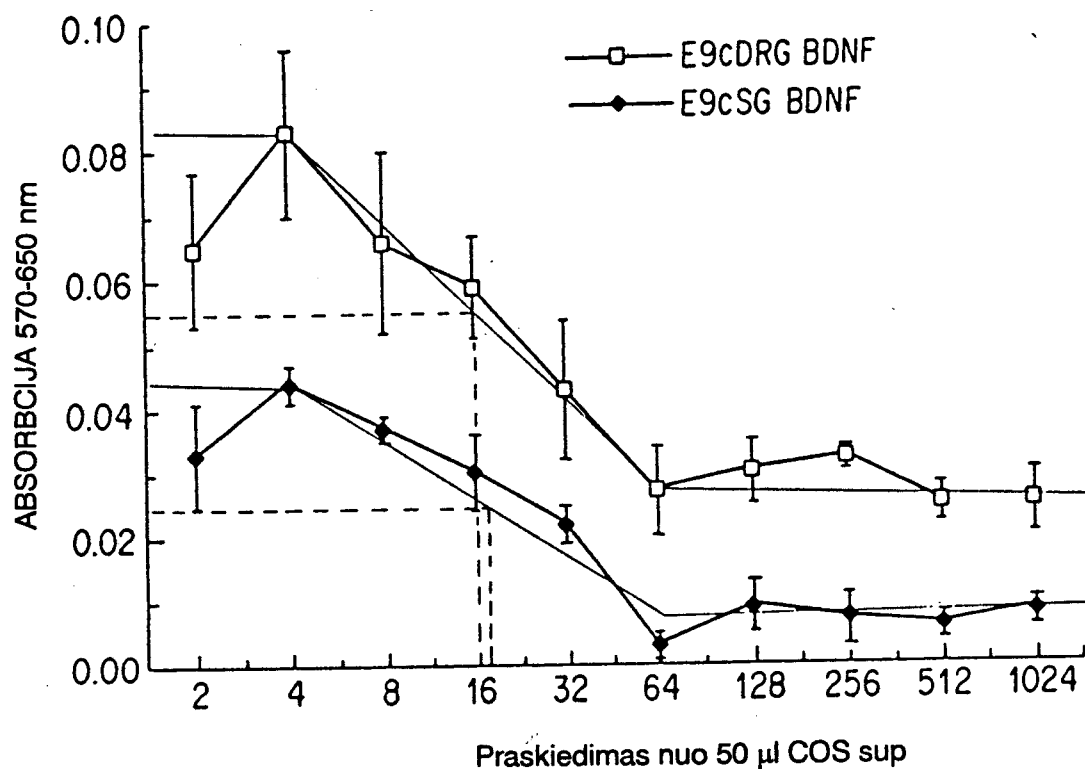
 MGYTKEGCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC TLTIKRGR

 MGYTKEGCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC TLTIKRGR

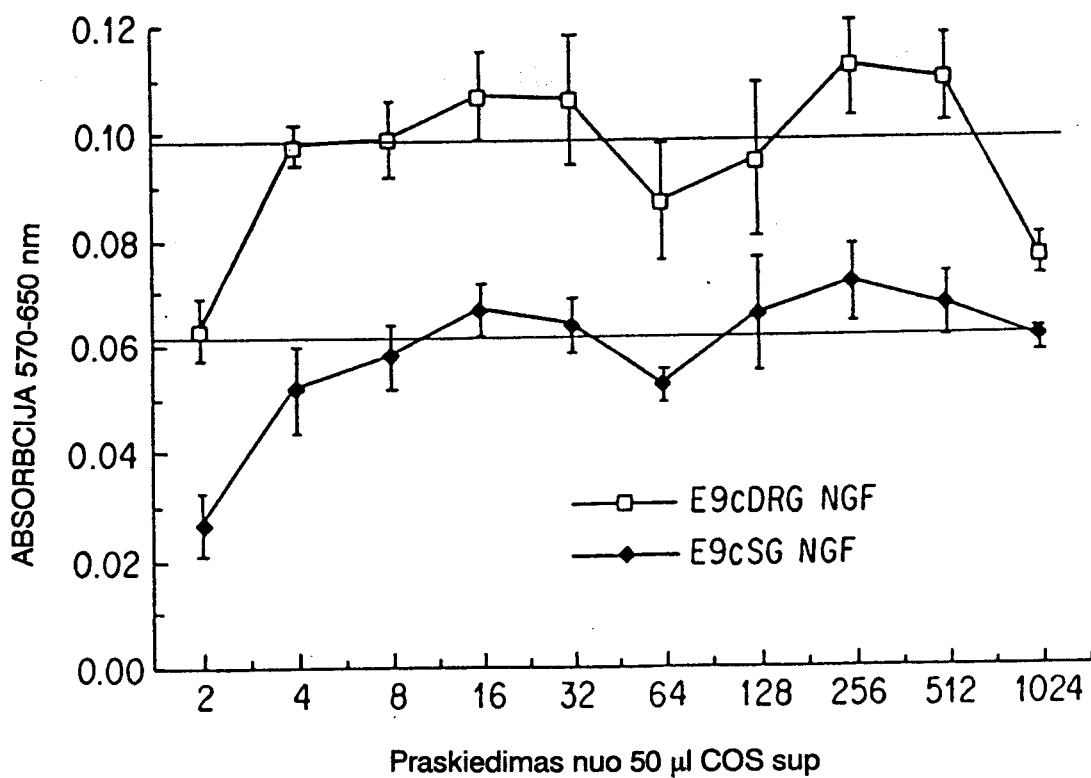
 *****GCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC TLTIKRGR
 sNPVES
 MGYTKEGCRG ID** *C RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC TLTIKRGR
 SKHWNSY
 MGYTKEGCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC TLT
 GGKDELSTIV
 sNPVESGCRG IDSKHWNSYC TTTHTEVKAL TTDeKQ-AAWR FIRIDTACVC VLSRKAtR
 GGKDELSTIV
 MGYTKEGCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGWR FIRIDTSCVC TLTIGGKDELSTIV

Iā. 5C
 pav.

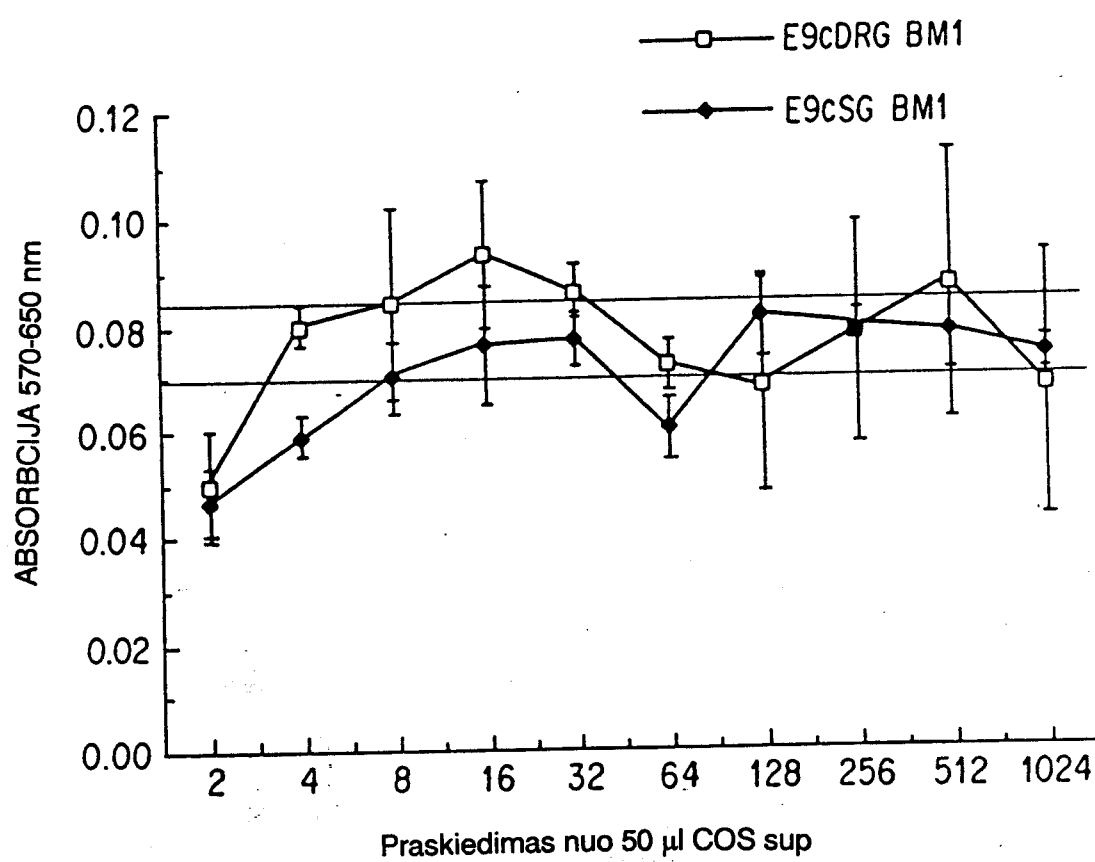
5D
 PAV.



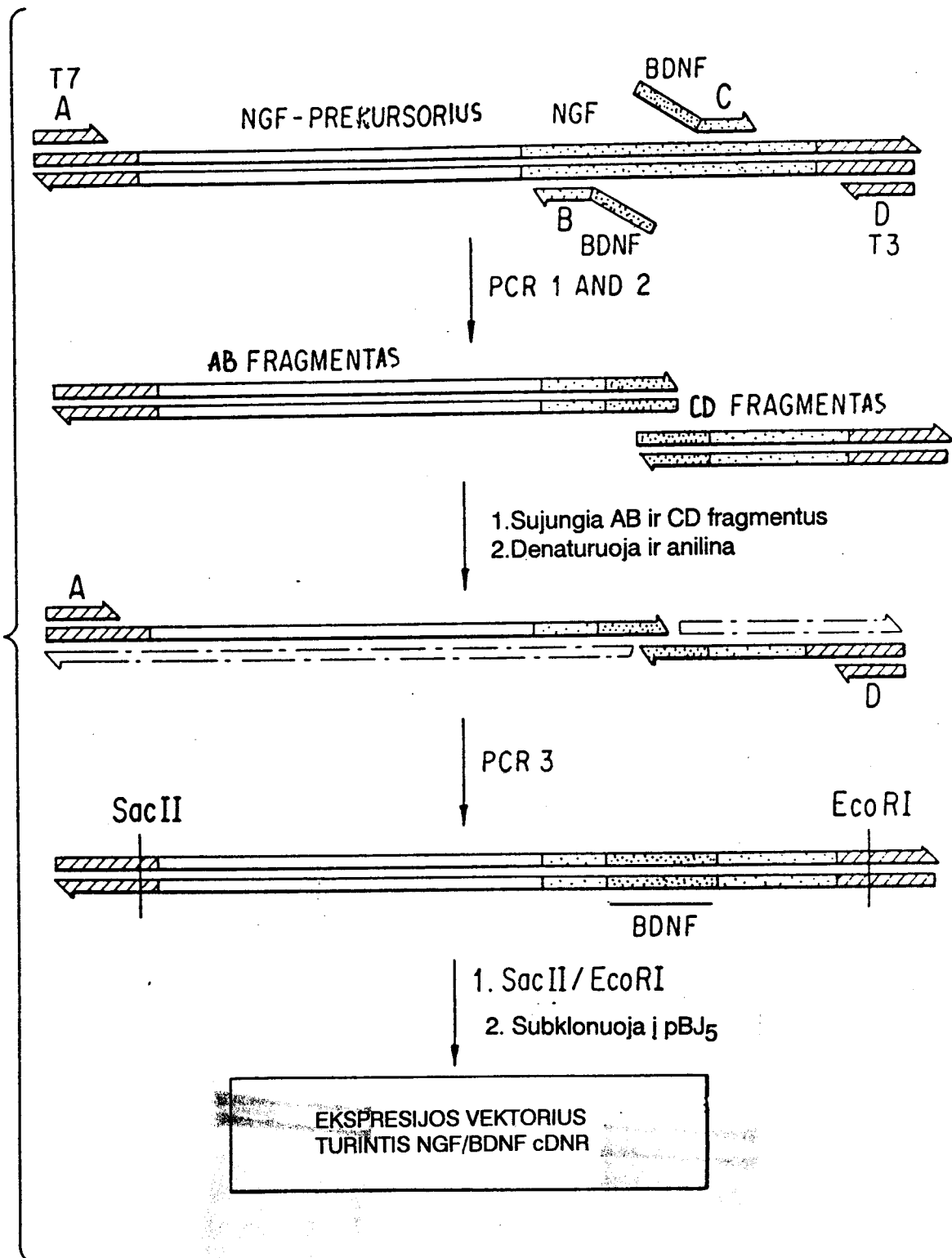
6A PAV.

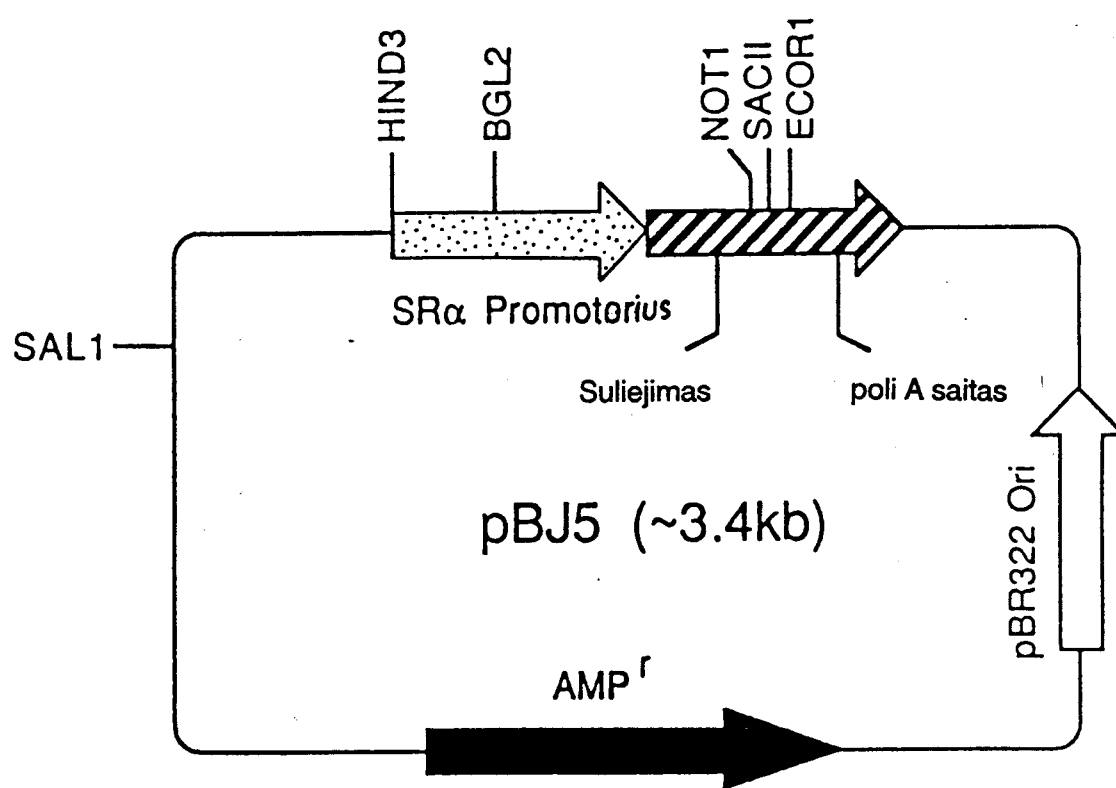


6B PAV.

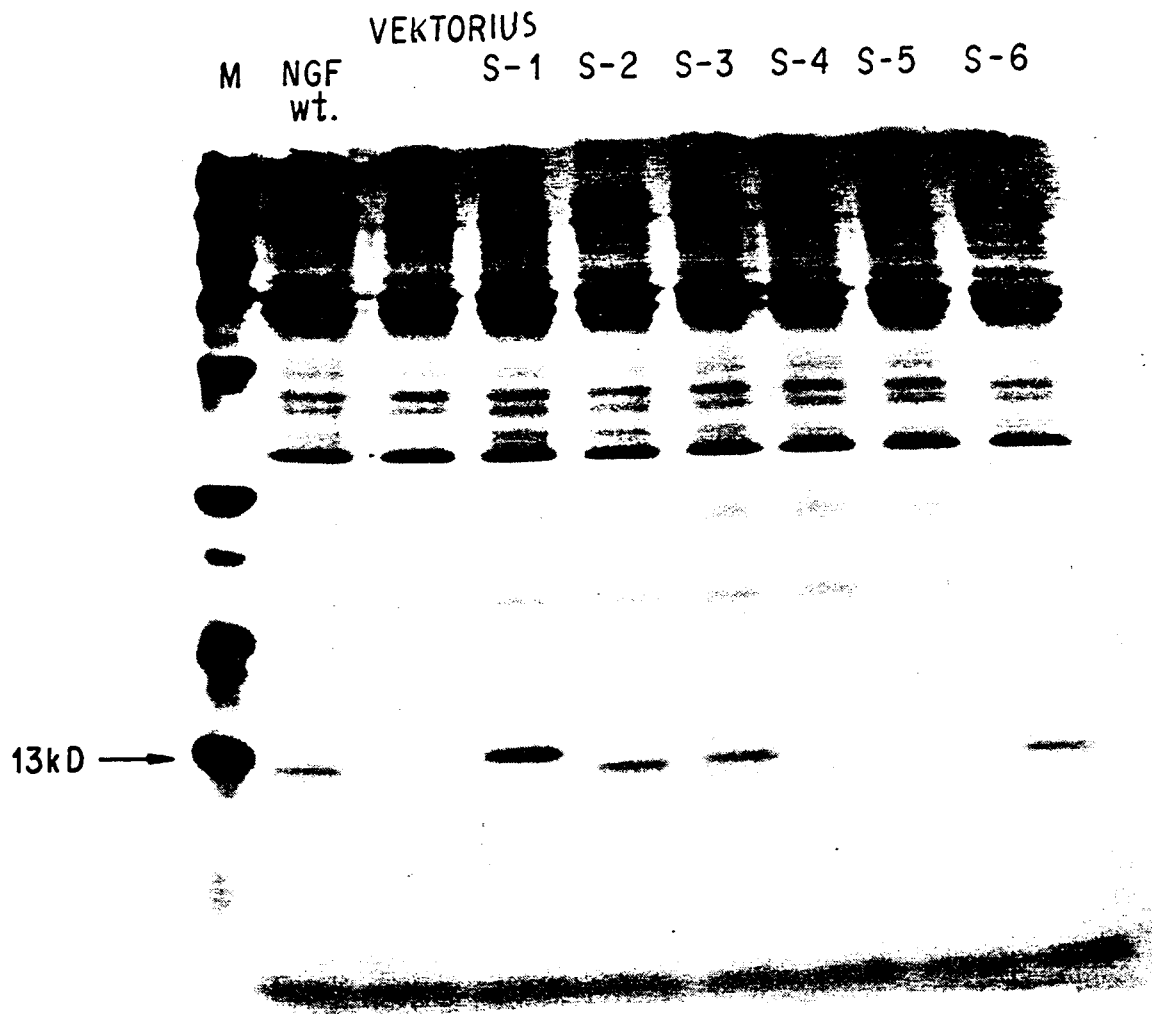


6C PAV.

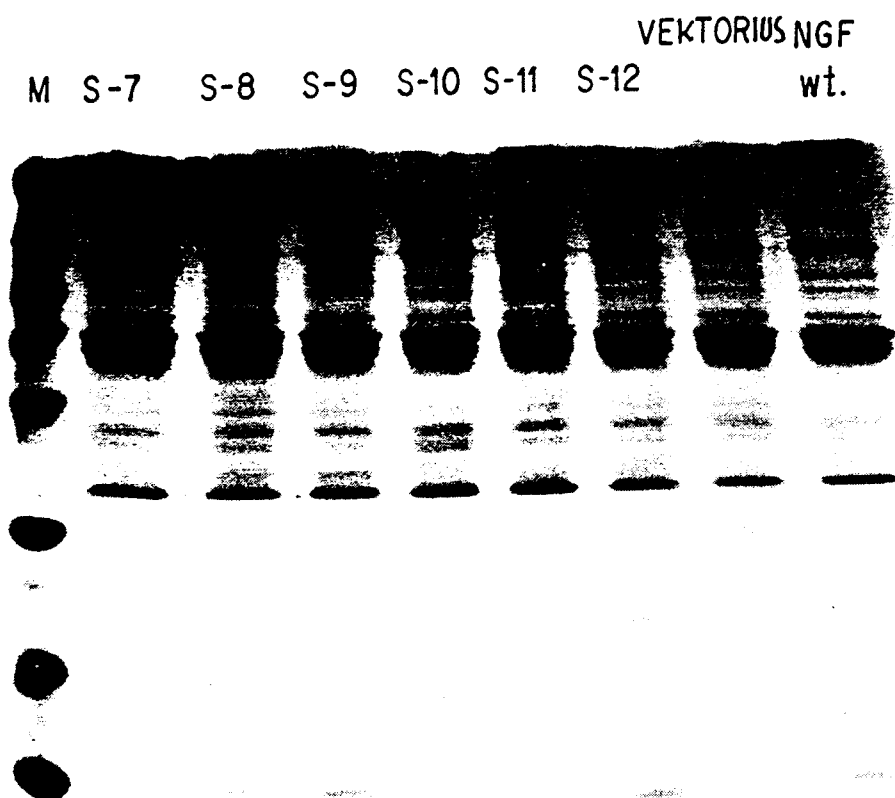




8A PAV.

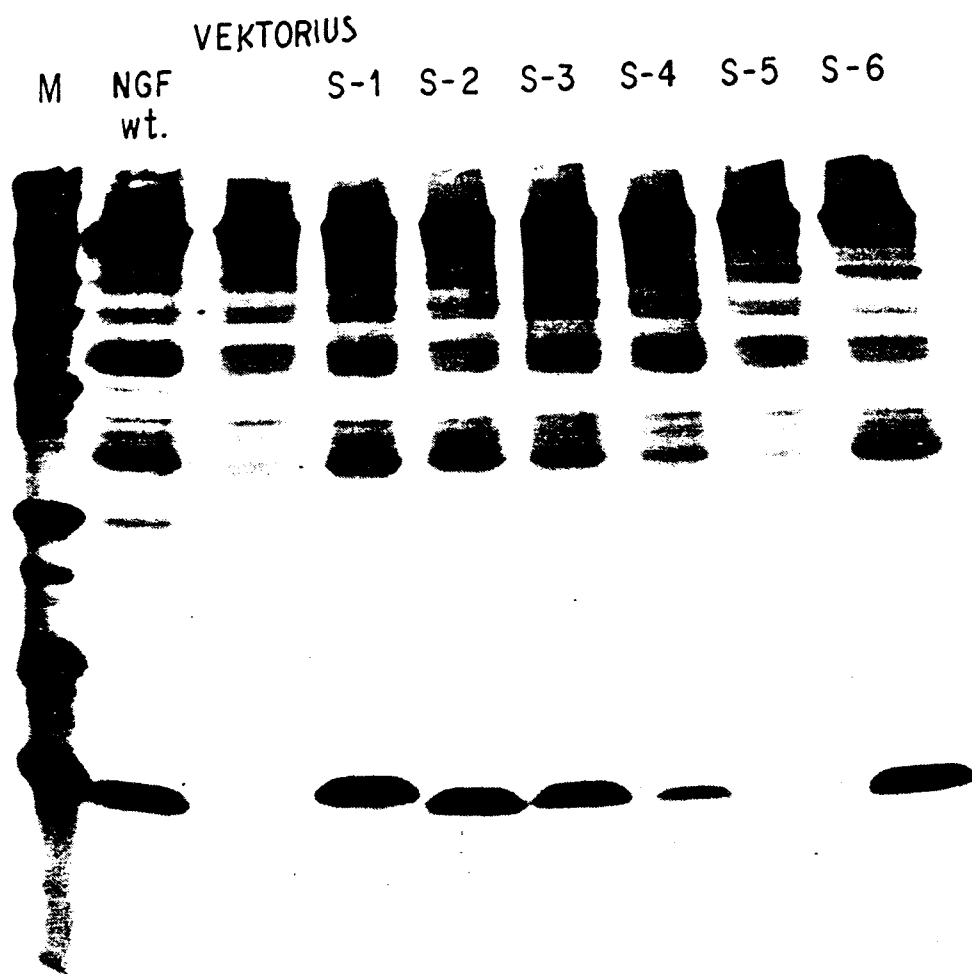


8B PAV.

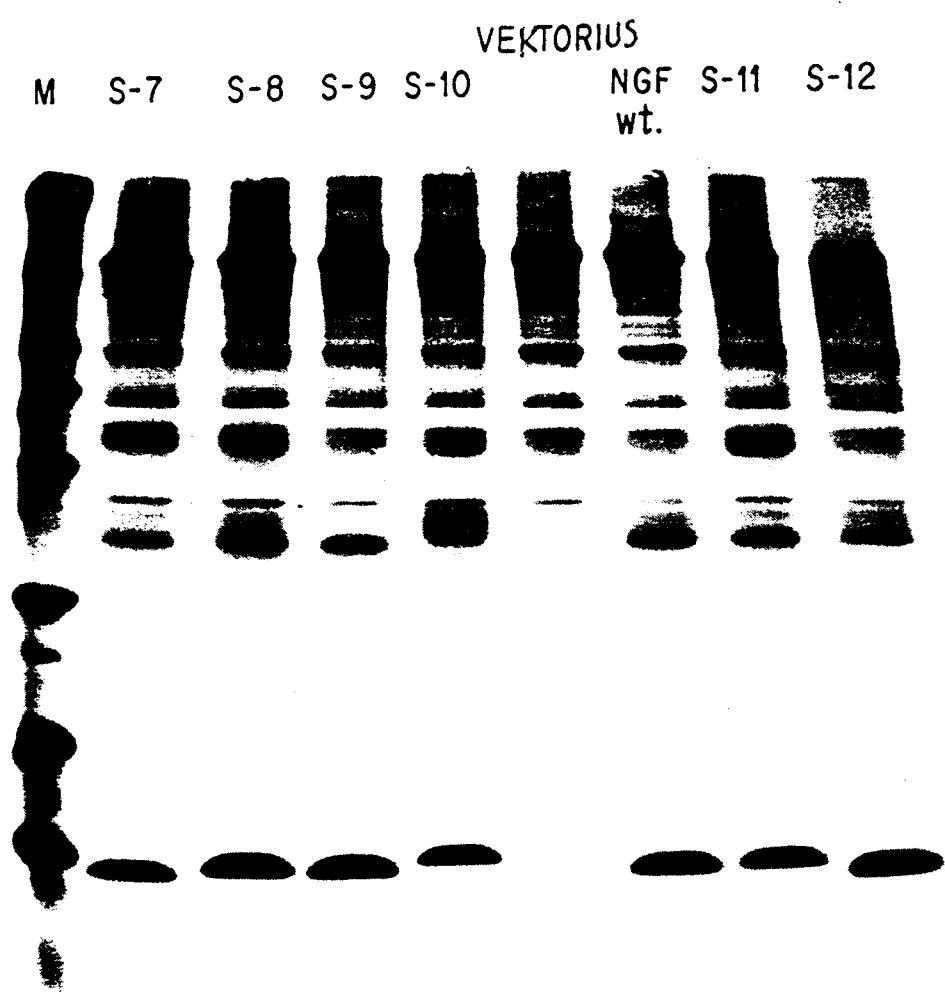


8B PAV. (tęsinys)

185



8C PAV.



8C PAV. (tęsinys)

9B PAV.

9C PAV.

227

Iš 10A		pav.		TĖSINYS 10C PAV.	
50	60	70	80	90	
* *	* *	* *	* *	* *	
EVNINNSVFK QYFFETKCRd	PNPVDGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
EVNINNSVFK QYFFETKCRd	PNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
EVNINNSVFK QYFFETKCRd	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
KVPVSKQLK QYFYETKCNP	MGYTKGCRG	IDKRHWNSQC	RTQSYVRAL		
EIKTGNSPVK QYFYETRCKE	ARPVKNGCRG	IDDKHWNSQC	KTSQTYVRAL		
EVNINNSVER QYFFETKCRd	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
EVNINNSVER QYFFETKCRd	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
EVNINNSVER QYFFETKCRd	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
* NINNSVER QYFFETKCRd	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL		
KV					

			BIO-AKTYVUMAS			
			PC12	DRG	SCG	NOD
	100	110				
	*	*				
TmDgKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAVRRa				
TTDDKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAARRG				
TTDeKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKAtRRG>	100%	5		
TMDSKKRIGWR	FIRIDTSCVC	TLTIKRGR>	0%	3-4	0	3-4
TSENNKLVGWR	WIRIDTSCVC	ALSRKIGRT>	0%*	3-4	3	3-4
TTDEKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKATRRG>	25-50%	5	+	2
TTDEKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKATRRG>	100%	5	++	0
TTDEKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKATRRG>	100%	5	++	0-0.5
TTDEKQ-AAWR	FIRIDTACVC	VLSRKATRRG>	25-50%	3	-/+	2-3

IS 10B
pav.

10C
PAV.

2740

5 (NOTE ASN AT 43)

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

6

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

7

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

8

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

9

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

10

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

11

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

12

PELĒS NGF
ŽMOGAUS BDNF

SSTHPVFHMG EFSVCDSVSV WV--GDKTTATD IKGKEVTVLA

TEŠINYS 10 E PAV.

10D

PAV.

731

EV***** QYFFETKCRA P V S K G Q L K	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL
EVNINNSVFR * QYFYETKC	RA SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL
EVNINNSVFR QYFFETKC** NP MGYTKEGC	***** RG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL
EVNINNSVFR QYFFETKCRA	SNPVEGCRG	** * RG IDKRHWNSQC	TTHTFVKAL
EVNINNSVFR QYFFETKCRA	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	* *** * RTTQSYVRAL
EVNINNSVFR QYFFETKCRA	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL
EVNINNSVFR QYFFETKCRA	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL
EVNINNSVFR QYFFETKCRA	SNPVEGCRG	IDSKHWNSYC	TTHTFVKAL

1310D
pav.

TESINYS 10 F PAV.

232

BIO-AKTYVUMAS

PC12 DRG SCG NOD
5-10% 1 - 2

TTDEKQ-AAWR FIRIDTACVC VLSRKATRRG>

TTDEKQ-AAWR FIRIDTACVC VLSRKATRRG>

TTDEKQ-AAWR FIRIDTACVC VLSRKATRRG>

TTDEKQ-AAWR FIRIDTACVC VLSRKATRRG>

TDEKQ-AAWR FIRIDTACVC VLSRKATRRG>
T

T* * *--** IRIDTACVC VLSRKATRRG>
MDSKKRIGWR F

TTDEKQ-AAWR F * VLSRKATRRG>
IRIDTSCVC

TTDEKQ-AAWR FIRIDTACVC * * * *
TLTIKRGR

IŠ10E
pav.

10F PAV.

133

V1 ↓ V2 ↓

YAEHKSHRGEYSVCDSESLWVT**DKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQFYETRC
SSTHPVFHMGFEFSCDSVSWV**GDKTTATDIKGKEVTVLAENVININSVFRQYFETKC
HSDPARRGELSVCDSISEWVTAADKKTAVDMSGGTIVLEKVPVSKGQLKQIFYETKC

NT-3
NGF
BDNF

$\frac{V3}{\text{KEARPVKN} \text{GCRGIDDKHWN} \text{SQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRIDTSCV} \text{CALS} \text{RKIGRT}}$
 $\frac{V4}{\text{RASNPV} \text{ESGCRGIDSKHWN} \text{SYCTTTHTFVKALTTDEKQ}^* \text{AAWR} \text{FIRIDTACV} \text{CVLS} \text{RKATRRG}}$
 $\frac{V5}{\text{NPMGYTKEGCRGIDK} \text{RHWNSQCR} \text{RTTQSYVRALTMDSK} \text{KRIGWR} \text{FIRIDTSCV} \text{CCTL} \text{TKRGR}}$

NT-3
NGF
BDNF

11 PAV.