

(19)



(10) **LT 2013 104 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2013 104**

(51) Int. Cl. (2015.01): **A61K 38/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2013 09 27**

C07K 14/00

C12N 15/00

C12P 21/00

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015 04 27**

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

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

UAB PROFARMA, V, Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Jonas Henrikas PESLIAKAS, LT

Milda PLEČKAITYTĖ, LT

Edita MIŠTINIENĖ, LT

Gitana ŽVIRBLYTĖ, LT

Indrė PETREIKYTĖ, LT

Andrius LEIVA, LT

Arūnas STIRKĖ, LT

Gintautas ŽVIRBLIS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Liudmila GERASIMOVIČ, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis”,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus sulieti baltymai su kitais
augimo faktoriais, optimaliai su kamieninių ląstelių faktoriumi, ir jų gavimo
būdas**

(57) Referatas:

Išradime pateikiamas sulietų baltymų, konkrečiau granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ir kamieninių ląstelių faktoriaus, sujungtų linkerine seka, heterodimerų gavimo būdas ir biologinės savybės. Išradimo multimerinės konstrukcijos gali būti naudojamos terapijoje, nes pasižymi sinergetiniu veikimu ir ilgesniu cirkuliacijos pusamžiu lyginant su kiekvienu iš monomerinių baltymų atskirai.

GRANULIOCITŲ KOLONIJAS STIMULIUOJANČIO FAKTORIAUS SULIETI BALTYMAI SU KITAIS AUGIMO FAKTORIAIS, OPTIMALIAI SU KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ FAKTORIUMI, IR JŲ GAVIMO BŪDAS

5 Išradimo sritis

Šis išradimas priskiriamas biotechnologijos sričiai ir yra skirtas terapinės paskirties baltymų gavimui. Šis išradimas atskleidžia galimybes gaminti genetiškai sulietus granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (G-CSF) heteromultimerus su kitais partneriais, tokiais kaip hematopoetiniai augimo faktoriai, kurie veikia sinergetiškai su G-CSF, ir multimerinės konstrukcijos pasižymi ilgesniu cirkuliacijos pusamžiu lyginant su kiekvienu iš monomerinių baltymų atskirai. Konkrečiau, šis išradimas susijęs su granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus heterodimero, kuris sudarytas iš granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus genetiškai sujungto per pasirinkto ilgio ir struktūros linkerinę seką su kamieninių ląstelių faktoriumi (SCF), o taip pat su heterodimerinio biologiškai aktyvaus baltymo G-CSF – SCF išskyrimu ir gryninimu. Šis išradimas taipogi sietinas su sintetiniu genu, koduojančiu heterodimerinę baltymo formą, kurioje G-CSF ir SCF yra sujungti pasirinktu linkeriu tarp monomerinių grandžių, taip pat ir geno biosinteze šeimininko ląstelėse.

Išradimo technikos lygis

Šioje paraiškoje terminas "terapinės paskirties baltymas" reiškia farmakokologiškai aktyvų genų inžinerijos būdu gaminamą baltymą, žinduolių antikūnus, kraujo produktų pakaitalus, vakcinas, hormonus, citokinus. Efektyvumui užtikrinti, baltyminiai vaistiniai preparatai yra naudojami skirtingų koncentracijų ir aplinkybėmis nei jų natyvūs partneriai ir tai gali sukelti *in vivo* nepageidaujamus poveikius. Tam, kad išvengtume arba sumažintume toksiškumą ir pakeltume jų efektyvumą, baltymų fizikocheminės ir biologinės savybės keičiamos jų modifikavimu, tokiu kaip kovalentinis konjugavimas su kitomis makromolekulėmis, antikūnais, bei baltymo mutageneze ir/arba glikoziliniu.

Terminas "hematopoetinis augimo faktorius" reiškia vieną arba grupę baltymų tokių kaip eritropoetinas, interleukinai ir kolonijas stimuliuojantys faktoriai, kurie skatina ląstelių proliferaciją.

Terminas „biologiškai aktyvus baltymas“ reiškia baltymo molekulę, kuri aktyvumo nustatymo testuose parodo tą patį ar panašų biologinį aktyvumą, kaip ir atitinkamas natūralus baltymas.

Terminas "monomerinė grandis" (pvz.: multimeriniuose baltymuose) reiškia natūralaus biologiškai aktyvaus baltymo molekulės polipeptidinę grandinę.

Terminas "heteromultimeras" reiškia linijinę polipeptidinę grandinę, kuri sudaryta iš mažiausiai dviejų skirtingų biologiškai aktyvių monomerinių polipeptidinių grandžių, sujungtų tarpusavyje peptidine linkerine seka tokiu būdu, kad galimybė sudaryti tarpmolekulinius disulfidinius ryšius tarp polipeptidinių grandžių yra minimali.

Terminas "genetiškai sulietas" reiškia, kad heteromultimerinis baltymas yra gaunamas rekombinantinės DNR būdu: DNR fragmentas, sudarytas iš dviejų monomerinius baltymus koduojančių genų ir linkerio DNR sekos yra įvedamas į vektorių baltymo ekspresijai pasirinktoje ląstelių linijoje. Toks rekombinantinis baltymas sudarytas iš monomerinių baltymų, sujungtų peptidiniu linkeriu (baltymas gali būti išskirtas naudojant specialias gryninimo procedūras) skiriasi nuo "cheminio konjugato", kuris gaunamas cheminiu būdu jungiant du arba daugiau monomerinių baltymų specifiniais cheminiais metodais, ir „chemiškai modifikuoto“ baltymo, kuris gaunamas cheminiu būdu modifikuojant monomerinį baltymą cheminiais agentais arba polimerų liekanomis.

Terminas „sinergetinis veikimas“ arba „sinergizmas“ reiškia bendrą vaistinių preparatų veikimą tokiu būdu, kad vienas jų papildo arba sustiprina kito veikimą išgaunant efektyvumą, kuris yra didesnis nei tas kuris būtų pasiektas su bet kurio vieno vaistinio preparato ekvivalentiniu kiekiu, arba gaunant efektus, kurie negali būti pasiekiami su bet koku saugiu kiekiu bet kurio vieno arba abiejų vaistinių preparatų. Kartu sinergetiškai veikiantys du ar daugiau vaistų duoda didesnį efektą nei jų individualių efektų suma.

Rekombinantinės DNR metodais gaunamų, terapinės paskirties baltymų naudojimas per paskutinius dešimtmečius žymiai išsiplėtė. Metinės pasaulinės gamybos apimtys visos eilės jau tradiciniais tapusių biofarmacinių produktų, tokių kaip insulinas, eritropoetinas (EPO), augimo hormonas (hGH), interferonai (IFN), granulocitų (makrofago) kolonijas stimuliuojantys faktoriai (G-CSF arba GM-CSF) jau viršija dešimtis milijardų dolerių ir toliau didėja. Pastaraisiais metais atskleidžiamos naujos minėtų produktų klinikinės indikacijos bei naujos jų klinikinio naudojimo sritys, taikant kombinuotą kelių baltymų terapiją.

Jau daugiau nei tris dešimtmečius žinoma, kad hematopoezę kontroliuoja labai specifiniai faktoriai, kurie hematopoetinėje sistemoje veikia ankstyvasias ląsteles jas paverčiant funkcionaliomis ląstelėmis. Šių faktorių išskyrimas iš natūralių šaltinių, gryninimas ir jų klonavimas sąlygojo naujos klasės terapinių agentų, tokių kaip kolonijas stimuliuojantys

faktoriai, interleukinai, atradimą. Vienas jų, granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius specifiškai veikia neutrofilus, svarbiausią kūno apsauginę sistemą prieš infekcijas.

Bakterinėse sistemose produkuojamas G-CSF, žinomas jo generiniu pavadinimu

5 "Filgrastimas" (r-metžG-CSF) atvėrė platų jo terapinį panaudojimą gydant neutropeniją – dominuojantį šalutinį vėžio chemoterapijos reiškinį. Jo naudojimas įgalino sumažinti vėžio pacientų infekcijos riziką. Šalia chemoterapijos sukeltos neutropenijos, Filgrastimas buvo patvirtintas gydant mielosupresiją po kaulų čiulpų transplantacijos, ūmią chroninę neutropeniją, ūmią leukemiją, platinę anemiją, mielodisplastinį sindromą. Filgrastimas taip

10 pat naudojamas periferinio kraujo ląstelių pirmtakų mobilizacijai transplantacijoje. [žiūr. apžvalgą: Karl Welte, Janice Gabrilove, Miguel H. Bronchud, Erich Platzer, and George Morstyn, Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, Vol 88, No 6 (September 15), 1996: pp 1907-1929].

Pastaruoju metu G-CSF indikacijų ratas plečiasi, ir intensyviai tiriamas jo kombinuotas

15 terapinis veikimas kartu su kitais citokinais. Tai atveria naujas G-CSF klinikinio naudojimo sritis.

Yra žinomos įvairios G-CSF terapinio naudojimo sritys:

- G-CSF, šalia jo pagrindinės indikacijos gydant chemoterapijos sukeltą neutropeniją, buvo

20 tiriamas kaip naujas neinvazivus terapinis agentas gydant Alzheimerio ligą [Kuen-Jer Tsai et al, G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *JEM. The Rockefeller University Press*, Vol. 204, No. 6, June 11, 1273–1280, 2007];

- aprašytas G-CSF polipeptido, taip pat ir kartu su papildomais augimo faktoriais, įskaitant SCF, panaudojimas miokardo infarkto prevencijai arba pastarojo ir kitų išeminių sutrikimų

25 gydymui, ypač gydant ūmų miokardo infarktą [WO2005044296, prior. 2003-10-27];

- paskelbta, kad G-CSF mobilizuotos pirmtakų ląstelės ne tik geba diferencijuoti audinius, bet, ko gero, geba regeneruoti miokardą, tuo pačiu pagerinant širdies funkciją [Tsong-Ming Lee et al. Granulocyte colony-stimulating factor increases sympathetic reinnervation and the arrhythmogenic response to programmed electrical stimulation after myocardial

30 infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H512–H522, 2009];

- G-CSF gali būti naudojamas neurodegeneracinių susirgimų ir glaukomos gydymui [T. Frank et al. Both systemic and local application of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is neuroprotective after retinal ganglion cell axotomy. *BMC Neuroscience* 2009];
- atskleistas G-CSF arba jo fragmentų panaudojimas farmacinėse kompozicijose, skirtose

35 gydyti išemijos sukeltus organų funkcijos sutrikimus pacientų, kuriems atliekama chirurginė

arba kita intervencinė procedūra siekiant pagerinti kraujotaką arba sukelti revaskuliarizaciją [WO 200504962 / EP1689420, prior. 2003-10-27];

- G-CSF skatina smegenų neurogenę subrendusiems gyvūnams, patyrusiems insultą [Aurel Popa-Wagner et al, Effects of granulocyte-colony stimulating factor after stroke in aged rats *Stroke* 2010, 41:1027-1031];
- G-CSF gali kelti kaulų čiulpų monobranduolinių ląstelių transplantacijos terapinį efektyvumą pelių su cerebrine išemija modelinėje sistemoje [Zhang et al. Granulocyte colony-stimulating factor increases the therapeutic efficacy of bone marrow mononuclear cell transplantation in cerebral ischemia in mice. *BMC Neuroscience* 2011, 12:61];
- aprašytas G-CSF ir placentinio augimo faktoriaus kombinuotos farmacinės kompozicijos panaudojimas kraujo kamieninių ląstelių mobilizacijai [WO2002014023 / EP1660115, prior. 2003-07-29].

Kombinuota terapija

- 15 Hematopoetiniai faktoriai pasižymi dublerio savybėmis, t.y. skirtingi faktoriai gali sukelti tą patį efektą. Šalia to, jie yra pleotropiniai, t.y. vienas citokinas gali sukelti skirtingus efektus. Citokinių tinklo *in vivo* kiekybinių savybių išsamiam supratimui svarbu suprasti kiek ir koku būdu vieno citokino efektai yra veikiami ir modifikuojami kitais citokinais, ir, ar tai priklauso nuo koncentracijos. Ryšium su tuo, buvo paskelbta apie citokinių kombinacijos *in vivo* sukeltus efektus tiriant visas galimas eritropoetino (EPO), G-CSF, kamieninių ląstelių faktoriaus (SCF) ir interleukino-11 (IL-11) kombinacijas. Autoriai [I. Boeder et al. Interactions of Erythropoietin, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Stem Cell Factor, and Interleukin-11 on Murine Hematopoiesis During Simultaneous Administration. *Blood*, Vol 91, No 9 (May 1), pp 3222-3229, 1998] parodė, kad citokinių priklausomybė nuo jų dozės *in vivo* yra modifikuojama kitu pridėtu citokinu kiekybiškai, ir kai kuriais atvejais, kokybiškai. Tai ir sudaro prielaidas labiau pagrįstam kombinuotos citokinių terapijos naudojimui.

- Yra žinoma, kad kai kurie citokinai, tokie kaip GM-CSF, SCF, IL-3, IL-6, IL-11 stimuliuoja granulopoezę, tačiau mažiau efektyviai nei G-CSF ir veikia su juo sinergetiškai, kad maksimaliai stimuliuotų granulopoezę.[S. Bradley Forlow et al. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood* 1 December, 2001 Volume 98, Number 12, 2001].

Pateikiamame išradime tarp aukščiau vardintų hematopoetinių faktorių pirmaeilis dėmesys skirtas žmogaus kamieninių ląstelių faktoriui (SCF), kurio sinergetinis veikimas kartu su G-CSF siūlo naujas galimybes jų kombinuotos terapijos panaudojimui klinikoje. Kaip žinoma, abu baltymai yra naudojami gydant neutropeniją onkologiniams pacientams po
 5 citotoksinės chemoterapijos arba kaulų čiulpų transplantacijoje siekiant išlaikyti normalų neutrofilų (granulocitų) skaičių. Buvo nustatyta, kad efektas gydant su abiem baltymais yra ženkliai aukštesnis nei gydymui naudojant atskirus baltymus. Sinergetinis efektas nustatytas rekombinantinėms abiejų baltymų formoms [J. A. Glaspy et al. *Peripheral Blood Progenitor Cell Mobilization using Stem Cell Factor in Combination with Filgrastim in*
 10 *Breast Cancer Patients*. *Blood*, vol. 90, pp 2939-2951, 1997/C. H. Moskowitz et al, *Recombinant Metionyl Human Stem Cell Factor and Filgrastim for Peripheral Blood Progenitor Cell Mobilization and Transplantation*, *Blood*, Vol 89, No 9, pp.3136-3147, 1997].

Patentas EP0992579 (prior. 1989-10-16 ir kt.) atskleidžia kamieninių ląstelių faktorių (SCF), jo gavimo būdus, farmacinę kompoziciją ir įvairius terapijos metodus gydant tokias
 15 būkles kaip leukopenija, trombocitopenja, anemija, stiprinant kaulų čiulpų atstatymą po radiacijos, arba chemoterapijos sukeltą kaulų čiulpų aplaziją arba mielosupresiją. Hematopoetinių susirgimų gydymui SCF yra naudojamas vienas arba kombinacijoje su vienu arba keliais papildomais hematopoetiniais faktoriais, tokiais kaip EPO, G-CSF, GM-CSF, ir įvairiais interleukinais nuo IL-1 iki IL-11, IGF arba LIF.
 20

Yra žinoma, kad rekombinantinė žmogaus SCF forma gali sustiprinti tiek Filgrastimo, tiek ir chemoterapijos kombinacijos kartu su Filgrastimu mobilizavimus. Mobilizuotos hematopoetinės ląstelės yra pajėgios greitam atsistatymui [L.B.To et al. *Stem cell mobilisation Successful mobilization of peripheral blood stem cells after addition of*
 25 *ancestim (stem cell factor) in patients who had failed a prior mobilization with filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) alone or with chemotherapy plus filgrastim*. *Bone Marrow Transplantation* (2003) 31, 371–378].

EP1817047 (prior. 2004-11-05) aprašomas G-CSF vieno arba jo kombinacijos su SCF
 30 panaudojimas apsaugant arba gydant smegenų susirgimus po cerebrinės išemijos arba neurologinių sutrikimų.

Ikklinikiniai ir klinikiniai tyrimai parodė, kad kaulų čiulpų kamieninių ir pirmtakų ląstelių perėjimas į infarktinį miokardą gali pagerinti kairiojo skilvelio sistolinę funkciją. Panašūs duomenys buvo gauti naudojant vieną G-CSF arba jo kombinaciją su SCF [M. T.

Kuhlmann et al. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. JEM vol. 203, 2006 87-97].

5 G-CSF ir SCF kombinuota terapija po cerebrinės išemijos yra efektyvus funkcinio atstatymo būdas panaudojant citokinų indukuojamą neuroninių ląstelių generaciją tiek iš kaulų čiulpų, tiek iš įgimtų nervinių kamieninių/pirmtakų ląstelių. Kadangi G-CSF ir SCF jau naudojami klinikoje, tai šie tyrimai siūlo naują terapinę strategiją insulto gydymui [H. Kanada et al. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic
10 neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 2006, 113:701-710].

SCF ir G-CSF pasižymi neuroapsauginiu veikimu, todėl yra palankūs funkciniam atstatymui, skiriant juos ūmioje ligos fazėje po smegenų išemijos. Tai liudija, kad hematopoetiniai augimo faktoriai iš tikrųjų dalyvauja smegenų veiklos atstatyme [Li-Ru
15 Zhao et al. Brain repair by hematopoietic growth factors in a rat model /Stroke ,2007;38: 2584-2591; Z. E. Toth et al. The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow -derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood*, 2008, vol. 111, No 12].

Sisteminis SCF kartu su G-CSF pateikimas į amiloido pirmtaką turinčias transgenines
20 peles sukelia ilgalaikį β-amiloidinių nuosėdų sumažėjimą smegenyse. Tai liudija apie hematopoetinių faktorių, SCF ir G-CSF indėlį stabdant β-amiloido kaupimąsi Alzheimerio ligos eigoje (AL) ir gali siūlyti naują terapinį sprendimą AL gydymui [B. Li et al. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor reduce β -amyloid deposits in the brains of APP/PS1 transgenic mice. *Alzheimer's Research & Therapy* 2011, 3:8].

25 Aprašytas vienas pirmųjų bandymų panaudoti kamieninių ląstelių terapiją su SCF ir G-CSF inkstų išemijos/reperfuzijos gydymui [G. Stokman et al. Hematopoietic Stem Cell Mobilization Therapy Accelerates Recovery of Renal Function Independent of Stem Cell Contribution. *J Am Soc Nephrol* 16: 1684–1692, 2005].

30 Tokiu būdu, paties G-CSF ir jo kombinuotos terapijos su SCF klinikinio naudojimo indikacijos siūlo plačias šių svarbių terapinių baltymų naudojimo perspektyvas. Tačiau svarbu pabrėžti, kad šiai dienai abu citokinai vienos vaistinės formos pavidalu dar nėra naudojami.

Ryšium su tuo, šio išradimo tikslas yra sukurti naują substanciją ir jos pagrindu „pagerintą“ vaistinę formą heteromultimerinės (heterodimerinės) konstrukcijos pavidalu, kurioje SCF ir G-CSF atveju abiejų baltymų monomerinės grandinės sujungiamos į vieną darinį, siekiant:

- išlaikyti maksimalų abiejų heteromultimero (heterodimero) partnerių biologinį
5 aktyvumą,
- prailginti cirkuliacijos *in vivo* pusamžį,
- pasiekti galimai naują visos heteromultimerinės (heterodimerinės) konstrukcijos sinergetinį aktyvumą ir atskleisti galimai naujas terapines indikacijas;
- žemesnės savikainos (viena substancija vietoje naudojamų dviejų).

10

Sulieti baltymai

Mėginimai gauti kitų hematopoetinių augimo faktorių heterodimerines konstrukcijas yra aprašyti mokslinėje ir patentinėje literatūroje.

- 15 WO9206116 (prior. 1990-09-29) aprašo rekombinantinę hematopoetinę molekulę kuri susideda iš pirmos hematopoetinės molekulės, turinčios ankstyvą mieloidinės diferenciacijos aktyvumą ir antros hematopoetinės molekulės, turinčios vėlesnį mieloidinės diferenciacijos aktyvumą. Šiame išradime pirmenybė teikiama molekulei, kurioje pirma hematopoetinė molekulė (IL-3 ar GM-CSF) prijungiama prie antros hematopoetinės
20 molekulės (EPO, G-CSF, IL-5, M-CSF) per aminorūgštinio linkerio seką, turinčią ne mažiau kaip dvi aminorūgštines liekanas. Pvz., IL-3-G-CSF hibridinis augimo faktorius stimuliuoja AML 193 ląstelių proliferaciją efektyviau nei abiejų citokinių mišinys.

Tačiau abiejų citokinių aktyvumas nėra nei sinergetinis, nei adityvus ir nėra pateiktas šios konstrukcijos PK/PD profilis. Neaišku, ar ši konstrukcija pasižymi ilgesniu cirkuliacijos
25 pusamžiu.

WO9417185 (prior. 1993-01-28) askleidžia G-CSF analogus su modifikuotomis aminorūgštinėmis liekanomis baltymo sekoje, jo chemiškai modifikuotus darinius bei hibridinę molekulę su prijungtu interleukinu. Patente nėra pateikiama duomenų apie abiejų citokinių partnerių sinergizmą ir hibridinės konstrukcijos prailgintą veikimą.

- 30 WO9712985 (arba US6730303, prior. 1995-10-05) aprašo hematopoetinę molekulę, kuri susideda iš biologiškai aktyvaus G-CSF modifikuotos molekulės, sujungtos tiesiogiai arba per įvairios aminorūgščių sudėties linkerinę seką su biologiškai aktyvaus IL-3 modifikuotais dariniais ir gautų darinių panaudojimą, stimuliuojant hematopoietinių ląstelių augimą.

Tačiau nėra duomenų, ar abiejų citokinų aktyvumas yra sinergetinis ir nėra pateiktas šios konstrukcijos PK/PD profilis. Neaišku, ar ši konstrukcija pasižymi ilgesniu cirkuliacijos pusamžiu.

- 5 Mokslinėje literatūroje taip pat aprašytas keletas mėginimų gauti hematopoetinius citokinus, suliejant juos tarpusavyje per jungiamąją aminorūgščių seką, ir siekiant tuo būdu sukurti sulietą baltymą, turintį dvigubą funkciją. Straipsnyje [T. Chen et al., Design of recombinant stem cell factor–macrophage colony stimulating factor fusion proteins and their biological activity in vitro. *Journal of computer-aided molecular design* (2005) 19: 319–328, 2005] pateikiamos nuorodos į sulietų citokinų konstrukcijas - IL-3/GM-CSF, EPO/IL-3, GM-CSF/EPO ir pan. pažymint, kad kai kurie iš jų buvo sėkmingai sumodeliuoti taip, kad abiejų partnerių funkcijos buvo pagerintos ir netgi atsirado naujos funkcijos dėl jų sinergetinio veikimo.

- 15 Tačiau kai kurie sulieti baltymai buvo sukonstruoti nesėkmingai ir jų aktyvumas buvo mažesnis nei tikėtasi. To priežastimi gali būti netinkamai parinkta linkerinė aminorūgščių seka arba netinkamas pasirinktų partnerių jungimo į sulietą konstrukciją eiliškumas (seka), kas gali pasireikšti jų tarpusavio erdviniais trukdymais. Šiame kontekste parodyta, kad G-CSF C-galinės dalies modifikacija suliejant jo pilną aminorūgščių seką su SCF per Lys¹⁴⁸ aminorūgštinę liekaną neįtakoja jo biologinio aktyvumo tiek CFU-G kolonijų susidarymo, tiek ir proliferacijos teste [Oshima et al., Biological activity of human granulocyte colony stimulating factor with a modified C-terminus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267, 924–927, 2000]. Atvirkščiai, G-CSF N-galo modifikavimas prijungus pvz, neaktyvų difterijos toksiną, 200 kartų sumažino baltymo gebėjimą stimuliuoti granulocitų kolonijų susidarymą, ir tai patvirtino, kad G-CSF N-galas yra svarbus jungimuisi prie savo receptoriaus.

Buvo sukonstruoti G-CSF-IgG-F_c ir G-CSF-IgG-C_H sulieti baltymai, kurių imunoglobulino G (IgG) F_c ir C_H dalys prijungtos prie G-CSF C-galo per lanksčią septynių aminorūgščių jungiamąją seką (SGGSGGS).

- 30 Tačiau šių sulietų baltymų aktyvumas buvo 2-3 kartus mažesnis lyginant su monomerinio G-CSF aktyvumu, nes G-CSF-IgG-F_c ir G-CSF-IgG-C_H formuoja homodimerines struktūras, sudarydami disulfidinius ryšius tarp IgG dalių [J. N. Cox et al., Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein. *Experimental Hematology* 32 (2004) 441–449].

Buvo sukonstruota keletas G-CSF ir transferino (T_f) sulietų baltymų (G-CSF- T_f) su skirtingomis jungiamosiomis sekomis: LE dipeptidu; (GGGGS)₃; A(EAAAK)₂A; A(EAAAK)₃A; A(EAAAK)₄A; A(EAAAK)₄LE A(EAAAK)₄A peptidais.

G-CSF- T_f heterodimeras gali būti absorbuojamas per skrandžio epitelį, tačiau mažas šio baltymo *in vitro* aktyvumas gali būti požymiu apie dviejų vienas su kitu sąveikaujančių domenų neigiamą poveikį sulieto baltymo konformacijai. Heterodimeras su ilgiausia α -spirale formuojančia jungiamąja seka turėjo 10 kartų mažesnį *in vitro* ląstelių proliferacijos aktyvumą dėl sąveikaujančių heterodimero domenų. Tokia sąveika yra linkusi sumažinti sulieto baltymo prisijungimą prie G-CSF ir T_f receptorių, todėl sumažėja *in vivo* mielopoetinis efektas gyvūnų tyimuose [Y. Bai and W.-C. Shen. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization., Pharmaceutical Research, Vol. 23, No. 9, September 2006].

Literatūroje taip pat yra keletas aprašytų kamieninių ląstelių faktoriaus (SCF) hibridinių molekulių su kitais citokinais:

Aprašytas chimerinis rekombinantinis SCF ir žmogaus IgG₁ (F_c dalies) sulietas baltymas ir parodyta, kad toks baltymas buvo 8 kartus aktyvesnis augimo veiksnio skatinamoje proliferacijoje lyginant su vienu SCF [U. Erben, et al., Differential effects of a stem cell factor-immunoglobulin fusion protein on malignant and normal hematopoietic cells, [Cancer Res., 59, 2924–2930, June 15, 1999].

Trombocitopenija yra dažna pacientų, sergančių vėžiu ar kitomis ligomis, kurios veikia hematopoetines ląsteles, problema. SCF vienas neskatina megakariocitų kolonijų formavimosi, tačiau veikia sinergetiškai megakariopoezėje kartu su trombopoetinu (TPO). Jų komplementarus biologinis efektas megakariopoezei paskatino sulieto baltymo TPO-SCF, kuris skatintų sinergetinį aktyvumą, kūrimą. Šiame heterodimere TPO (1-157 aminorūgštys) ir SCF (1-145 aminorūgštys) sujungti jungiamuoju peptidu (GSGGGGSGG) galva-uodega (head-to-tail) būdu. TPO-SCF aktyvumas SCF atžvilgiu buvo 1,2 karto didesnis, lyginant su SCF monomeru ir TPO atžvilgiu buvo 1,7 kartus didesnis, lyginant su vienu TPO [Y. Zang et al., A novel thrombopoietin–stem-cell factor fusion protein possesses enhanced potential in stimulating megakaryocyte proliferation and differentiation. Biotechnol. Appl. Biochem. (2007) 48, 135–142, 2007].

SCF ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (M-CSF) gali veikti sinergetiškai skatinant monobranduolinių fagocitų augimą ir proliferaciją. Todėl SCF ir M-CSF buvo sulietas, imant pilną SCF polipeptidinę grandinę ir M-CSF 1-149 aminorūgščių seką ir

- jungiant jas peptidiniu (GGGGSGGGSGG) linkeriu galva-uodega (head-to-tail) būdu. SCF-M-CSF baltymo specifinis aktyvumas TF-1 ląstelių proliferacijos teste buvo 17 kartų didesnis nei rekombinantinio SCF atveju. Šioje konstrukcijoje SCF veikia sinergetiškai ir pasireiškia aukštesniu gebėjimu stimuliuojant megakariocitų kolonijų augimą [T. Chen et al., Expression of a novel recombinant stem cell factor/macrophage-colony stimulating factor fusion protein in baculovirus – infected insect cells. Protein Expr. Purif., 41, 402-408, 2005].
- Sukonstruotas pilno 165 aminorūgščių ilgio ir nepilno ilgio (1-145 aminorūgščių) SCF homodimeras, sujungtas trumpu peptidu (GGGGSGGGSGG) galva-uodega būdu.
- 10 Biologinio aktyvumo testavimas parodė, kad dimeras yra 8,7 karto aktyvesnis nei rekombinantinis žmogaus SCF monomeras [J. Han et al., Expression of a novel recombinant dual human stem cell factor in insect cells. Protein Expr. Purif. 31, 311-317, 2003].
- 15 Aukščiau aprašytoms G-CSF hibridinėms konstrukcijoms su kitais citokinais nėra pateikiama duomenų apie abiejų citokinų partnerių sinergizmą ir hibridinės konstrukcijos prailgintą veikimą. Pastaroji savybė pasireiškia G-CSF sulietuose konstrukcijose su IgG arba transferinu, tačiau abiem atvejais fiksuojamas žemesnis G-CSF aktyvumas, lyginant su jo nemodifikuota monomerine forma. SCF sulietuose konstrukcijose su kitais citokinais
- 20 stebimas SCF aktyvumo padidėjimas lyginant su jo monomerine forma, tačiau nieko nežinoma apie jo hibridinių konstrukcijų išsilaikymo serume trukmę ir jos galimą pailgėjimą.
- Ryšium su tuo, pagrindinis šio išradimo tikslas yra pasiūlyti būdą gaminti pagerintų savybių ("biobetter") biofarmacinius preparatus, kurie sudaryti iš mažiausiai dviejų
- 25 sinergetiškai veikiančių hematopoetinių augimo faktorių juos genetiškai jungiant į heteromultimerines, atskiru atveju heterodimerines konstrukcijas, kuriose abu partneriai yra sujungiami tam tikro ilgio linkeriu. Pastarojo seka ir struktūra svarbu parinkti taip, kad kiekviena monomerinė grandinė gebėtų sąveikoti su pasirinkto terapinio baltymo specifiniu receptoriumi ir išreikštų kiekvieno multimerinės konstrukcijos partnerio biologinį ir funkcinį
- 30 aktyvumą.
- Heteromultimerinės konstrukcijos molekulinė masė padidėja ir susideda iš kiekvienos monomerinės grandies ir linkerio molekulinų masių sumos. Ryšium su tuo, kitas šio išradimo tikslas yra pateikti dominančių terapinių baltymų heteromultimerines

konstrukcijas, kurių cirkuliacijos *in vivo* pusamžis yra ilgesnis nei atskirai kiekvieno partnerio buvimo serume laikas. Tai būtų išskirtinis biofarmacinių produktų gaminamų siūlomą būdu bruožas. Heteromultimerinės konstrukcijos molekulinės masės padidėjimas pats savaime nebūtinai gali iššaukti cirkuliacijos trukmės pailgėjimą bet kurio partnerio atžvilgiu. Yra žinoma, kad pvz., kovalentinis G-CSF dimeras, susidarantis per –S-S- jungtį tarp polipeptidinių grandinių, pasižymi dvigubai didesne molekuline mase, tačiau jo cirkuliacijos trukmė yra tokia pati kaip ir G-CSF monomerinei formai.

Dar vienas šio išradimo tikslas yra pateikti terapinių baltymų heteromultimerines formas, kurios gali būti gaminamos rekombinantinės DNR būdu išvengiant nepageidaujamų dimerinių, oligomerinių ir kt. produktų, kurie gali susidaryti, pvz. dėl tarpmolekulinių disulfidinių ryšių.

Šio išradimo išskirtinis bruožas būtų galimybė gauti ne tik *in vivo* prolongavimo efektus, bet ir dviejų skirtingų citokinų sinergetinį aktyvumą, plečiant terapinio panaudojimo galimybes (naujos vaistinės formos indikacijos) ir sumažinant tokių vaistinių produktų gavimo kaštus, nes būtų naudojama tik viena vaistinė forma vietoje dabar naudojamų dviejų atskirų terapinių baltymų.

Dviejų skirtingų terapinių baltymų heteromultimerinės formos gavimas sukelia eilę rimtų problemų, kuriant tikslinės konstrukcijos gryninimo technologiją siekiant tokį baltymą išgryninti iki lygio, kuris atitiktų farmacinei substancijai keliamus specifinius reikalavimus.

Pagrindinės kuriamo proceso stadijos nebūtinai bus analogiškos toms, kurios naudojamos individualiai kiekvieno heteromultimerinės konstrukcijos partnerio proceso stadijoms. Chromatografinio gryninimo stadijos, kurios yra pagrindinės kuriant šiuolaikinius procesus gali dramatiškai skirtis dėl kitokio heteromultimerinės konstrukcijos chromatografinio elgesio, lyginant su kiekvieno individualaus partnerio elgsena. Šalia to, didėja heteromultimerinės konstrukcijos molekulinė masė ir atsiranda pavojus neproduktyvios agregacijos reiškinių, ypač esant aukštam baltymo ekspresijos lygiui, kas veda prie jo kaupimosi ląstelėje netirpių tarpinių kūnelių pavidalu. Taigi, technologiniai sprendimai, tinkami monomerinių baltymo formų gavimui, yra netinkami baltymo heteromultimerinės konstrukcijos išskyrimui ir gryninimui. Tuo būdu, išskirtinis dėmesys turi būti skiriamas kiekvienai kūrimo proceso stadijai užtikrinant, kad visas procesas leistų išsaugoti maksimaliai galimą heterodimerinio baltymo partnerių biologinį aktyvumą.

Išradimo esmė

Pagrindinis išradimo objektas yra sulietas baltymas, kuris yra granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GCSF) heteromultimeras su kitu augimo faktoriumi, kur sulieto baltymo bendroji formulė (I)

5



(I)

- 10 kur L yra linkerinė seka, X yra augimo faktorius, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš SCF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-3, IL-6 ir IL-11, a yra lygus 0-4; b yra lygus 0-4, kur monomerinių grandžių aminorūgščių sekos yra bent 95% identiškos atitinkamų natyvių baltymų aminorūgščių sekoms.

- Pirmenybė yra teikiama šio išradimo bendrosios formulės (I) sulietam baltymui, kuriame X
15 yra SCF, a yra lygus 0 ir b yra lygus 0, ir linkerinė seka L yra pasirinkta iš aminorūgščių sekų grupės, susidedančios iš $(S-G_4)_n$, kur $n=2-8$ ir $SGLEA-(EAAAK)_m - ALEA-(EAAAK)_m - ALEGS$, kur $m=2-8$.

- Konkrečiau, sulietas baltymas pagal išradimą turi linkerinę seką L, kuri yra pasirinkta iš aminorūgščių sekų grupės, apimančios SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ
20 ID Nr. 4 ir SEQ ID Nr. 5.

Išradimo sulieto baltymo aminorūgščių seka yra pasirinkta iš grupės, apimančios SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9 ir SEQ ID Nr. 10.

- 25 Sulietas baltymas pagal išradimą pasižymi prailgintu cirkuliacijos laiku *in vivo* ir sinergetiniu veikimu.

- Kitas svarbus išradimo objektas yra rekombinantinės DNR fragmentas, koduojantis minėtą sulietą baltymą. Pirmenybė teikiama rekombinantinės DNR fragmentams, kur koduojanti
30 seka yra pasirinkta iš grupės, apimančios SEQ ID Nr. 11, SEQ ID Nr. 12, SEQ ID Nr. 13, SEQ ID Nr. 14 ir SEQ ID Nr. 15.

- Dar vienas svarbiausias išradimo objektas yra granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ir kamieninių ląstelių faktoriaus heterodimerinio baltymo pagal išradimą gavimo
35 būdas, kuris apima tokias stadijas:

a) konstruoja DNR fragmentą, koduojantį minėtą tikslinį genetiškai sulietą baltymą, ir paruošia bakterinį producentą;

b) producentą, kurio ląstelės turi DNR seką, koduojančią tikslinį genetiškai sulietą baltymą, kultivuoja tinkamoje mitybinėje terpėje sąlygomis, kurios tinkamos
5 heterodimerinės konstrukcijos ekspresijai,

c) vykdo producento mikroorganizmų lyzę ir atskiria netirpią baltymo frakciją,

d) tirpina netirpią baltymo frakciją,

e) vykdo tikslinio baltymo renatūraciją,

f) vykdo tikslinio baltymo chromatografinį gryninimą.

10 Būdas pagal šį išradimą skiriasi tuo, kad:

-stadijoje d) netirpią baltymo frakciją tirpina buferiniame tirpale esant chaotropiniam agentui karbamidui ir redukuojančiam agentui ditioneitolui;

- stadijos e) heterodimerinio baltymo renatūracija yra oksidacinė renatūracija tarpinės karbamido koncentracijos buferiniame tirpale esant redukuojančiam agentui ditioneitolui

15 (DTT) ir oksiduojančiam agentui oksiduotam glutationui (GSSG);

-stadijoje f) renatūruotą tikslinį baltymą grynina, nuosekliai atliekant anijonų mainų chromatografiją, su tolimesne mišraus veikimo chromatografija ir katijonų mainų chromatografija.

Minėtą heterodimerinio baltymo renatūraciją vykdo buferiniame tirpale, kurio pH 7.5 – 8.5
20 esant 2M karbamido koncentracijai, dalyvaujant ditioneitolui ir oksiduotam glutationui, kurių molinis santykis yra 5-1:1-5; pirmenybę teikiant buferiniam tirpalui, kurio pH 8.0 ir DTT:GSSG moliniam santykiui 1:5.

Būdo pagal išradimą įgyvendinimo vienu aspektu stadijos f) anijonų mainų chromatografiją vykdo su DEAE-Sepharose FF sorbentu prie pH 7.0 – 8.5 pirmenybę teikiant pH reikšmei
25 7.5 taikant laiptinę eliaciją; mišraus veikimo chromatografiją vykdo su CHT hidroksiapatito sorbentu prie pH 6.5 – 7.5 pirmenybę teikiant pH reikšmei 7.2; katijonų mainų chromatografiją vykdo su SP-Sepharose FF sorbentu prie pH 4.5 – 5.2, pirmenybę teikiant pH reikšmei 4.7; gautą tikslinio baltymo tirpalą koncentruoja ir saugo natrio acetatiniame buferiniame tirpale.

30

Kitu būdo pagal išradimą įgyvendinimo aspektu stadijoje a) minėtą DNR fragmentą, koduojantį tikslinį genetiškai sulietą baltymą, įjungia į ekspresijos plazmidę pET21b ir atrinktas plazmidės transformuoja į bakterijų *E. coli* BL21(DE3) kamieną, ir stadijoje b)

minėtą producentą kultivuoja LB terpėje 37°C temperatūroje iki optinio tankio (OD_{600nm}) 0,8-1,2, induktoriumi naudojant izopropil- β -D –tiogalaktopiranozidą.

Dar vienas pateikiamo išradimo objektas yra sulietas SCF-GCSF baltymas, gautas aukščiau apibūdintu išradimo būdu. Toks sulietas SCF-GCSF baltymas yra skirtas
5 naudoti terapijoje.

Ir dar vienas išradimo objektas yra farmacinė kompozicija, apimanti minėto sulieto baltymo terapiškai veiksmingą kiekį ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį ir/arba farmaciniu požiūriu priimtinas pagalbines medžiagas.

10 Brėžinių aprašymas

Fig. 1 parodo SCF-G-CSF heterodimero elektroforetinio švarumo kitimą gryninimo stadijose, būtent SCF-G-CSF heterodimero baltymų elektroforetinis vaizdas redukuotomis sąlygomis. Takeliai: 1 - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #26619 - baltymų molekulinės masės standartas; 2 – tarpinių kūnelių mėginys; 3 – mėginys po
15 renatūracijos; 4 - mėginys po chromatografijos per DEAE sefarozę; 5 - mėginys po chromatografijos per hidroksiapatitą CHT; 6 - mėginys po chromatografijos per SP sefarozę.

Fig. 2: SCF-G-CSF heterodimero išgryninto baltymo mėginių analizė Western blot metodu.(A) – įnešta 3 μ g SCF-G-CSF heterodimero redukuotomis sąlygomis ir
20 imunoblotingui buvo panaudoti monokloniniai antikūnai prieš G-CSF; (B) - įnešta 3 μ g SCF-G-CSF heterodimero redukuotomis sąlygomis ir imunoblotingui buvo panaudoti polikloniniai antikūnai prieš SCF.

Fig. 3: Išgryninto SCF-G-CSF heterodimero baltymo analizė SE-HPLC metodu. Eliuato absorbcija prie 280 nm. Smailė 1: laikas 2,329 min; aukštis 2,90963 e^{-1} mAU; plotas 2,0264%. Smailė 2: laikas 14,749 min; aukštis 7,56982 mAU; plotas 97,9736%.
25

Fig. 4. SCF-G-CSF heterodimero terminis stabilumas, būtent SCF-G-CSF heterodimero terminės denatūracijos kreivės. Viršutinė kreivė – SCF-G-CSF heterodimeras acetatiname buferiniame tirpale; apatinė kreivė – SCF-G-CSF heterodimeras PBS buferiniame tirpale.

Fig. 5. G-CSF, SCF, jų mišinio ir SCF-G-CSF heterodimero skatinamas absoliutus
30 neutrofilų skaičiaus kitimas *in vivo* žiurkių kraujyje. Neutrofilų skaičiaus kitimas žiurkių kraujyje po baltymų mėginių injekcijos. Žiurkėms buvo suleidžiami SCF-G-CSF heterodimero, SCF monomero, G-CSF monomero, SCF ir G-CSF mišinio mėginiai.

Neutrofilų kiekis kraujyje buvo tiriamas iškart po injekcijos, praėjus 24 val. po injekcijos ir praėjus 48 val. po injekcijos.

Fig. 6. G-CSF koncentracijos kitimas laike po G-CSF, SCF, jų mišinio ir SCF-G-CSF heterodimero injekcijos žiurkėms. G-CSF koncentracijos žiurkių kraujo serumo mėginiuose. Tiriamų baltymų serumo mėginiai buvo imami po 3, 6 ir 18 valandų ir nustatytos G-CSF koncentracijos žiurkių serumuose.

Detalus išradimo aprašymas

Šis išradimas atskleidžia naujo tipo heteromultimerus, kurie apima granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus monomerines grandines, genetiškai sujungtas per pasirinkto ilgio linkerinę seką su kitu hematopoetiniu augimo faktoriu.

Rekombinantinė šiuo išradimu siūlomo heteromultimero forma sudaryta iš genetiškai sulietų rekombinantinių biologiškai aktyvių ir sinergetiškai veikiančių baltymų monomerinių grandžių, kurios sujungtos tinkamu linkeriu ir kur partnerių monomerinės grandinės yra sudarytos iš natyvaus biologiškai aktyvaus baltymo sekos arba sekos, kuri identiška jai bent 95%. Tinkamo linkerio seka pasirenkama iš grupės, sisidedančios iš $(S-G_4)_n-S$ sekos, kurioje $n=2-7$, ir sekos $SGLEA-(EAAAK)_m-ALEA-(EAAAK)_m-ALEGS$, kurioje $m=2-8$. Pirmenybė šiame išradime teikiama linkerui su aminorūgštine seka pasirinkta iš grupės, kurią sudaro SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3, SEQ ID No:4 ir SEQ ID No:5.

Lentelė 1

Naudotų linkerių pavyzdžiai

Sekos Nr.	Pažimėjimas	Linkerio seka	Aminorūgščių skaičius
SEQ ID No:1	L2	$(SG_4)-(SG_4)-S$	11
SEQ ID No:2	L3	$(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-S$	16
SEQ ID No:3	L5	$(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-S$	26
SEQ ID No:4	L7	$(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-(SG_4)-S$	36
SEQ ID No:5	L α	$SGLEA-(EAAAK)_4-ALEA-(EAAAK)_4-ALEGS$	54

Šio išradimo heterodimerinės konstrukcijos gali apimti G-CSF ir bet kurį kitą hematopoetinį faktorių, kuris veikia su G-CSF sinergetiškai. Šalia to, šio išradimo būdu galima konstruoti heterodimerines konstrukcijas dalyvaujant bet kuriam augimo faktorių atstovui, atsižvelgiant į jų biologinės sąveikos su receptoriais ypatumus.

Viename pagrindinių išradimo įgyvendinimo variantų pirmenybė teikiama granulicijų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus heteromultimerui, kuris yra granulicijų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ir kamieninių ląstelių faktoriaus heterodimeras, turintis aminorūgščių seką, pasirenkamą iš sekų grupės SEQ ID No:6, SEQ ID No:7, SEQ ID No:8, SEQ ID No:9 ir SEQ ID No:10.

Lentelė 2

Heterodimerinių baltymų seka ir molekulinė masė

Sekos Nr.	Heterodimerinis baltymas	Molekulinė masė, kDa	Pilna heterodimerinio baltymo amino rūgščių seka
SEQ ID No:6	SCF-L2-GCSF	38,03	MEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKY VPGMDVLPSCWCISEMNVQLSDSLTDLLDKFS NISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLK KSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAS ETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAAS GGGGSGGGGSTPLGPASSLPQSFLKCLEQV RKIQGDGAALQEKLCA TYKLCHPEELVLLGHSL GIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQ GLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQ QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGG VLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP
SEQ ID No:7	d SCF-L3-GCSF	38,35	MEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKY VPGMDVLPSCWCISEMNVQLSDSLTDLLDKFS NISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLK KSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAS ETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAAS GGGGSGGGSGGGGSTPLGPASSLPQSFLK CLEQVRKIQGDGAALQEKLCA TYKLCHPEELV LGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSG FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQR RAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP
SEQ ID NO:8	SCF-L5-GCSF	38,98	MEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKY VPGMDVLPSCWCISEMNVQLSDSLTDLLDKFS NISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLK KSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAS ETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAAS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSTPLG PASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQ LAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTL DTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQG AMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRV LRHLAQP
SEQ ID NO:9	SCF-L7-GCSF	39,61	MEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKY VPGMDVLPSCWCISEMNVQLSDSLTDLLDKFS NISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLK KSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAS ETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAAS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG

			GSGGGGSTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQ GDGAALQEKLCAATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPW APLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQ ALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVA SHLQSFLEVSYRVLRLHAQP
SEQ ID NO:10	SCF-L α -GCSF	42,38	MEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKY VPGMDVLPSCWSEMVVQLSDSLTDLLDKFS NISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS SKDLK KSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAS ETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAAS GLEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKEAAAK EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKEAAAK LLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCAATYKLCHEPEE LVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLH SGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD FATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHAQP

Kitas labai svarbus šio išradimo objektas yra G-CSF ir SCF sulieto baltymo heterodimero gavimo būdas, apibūdintas aukščiau ir detaliau atskleistas žemiau pateiktuose išradimo įgyvendinimo pavyzdžiuose, kuris leidžia išskirti ir išgryninti tikslinį sulietą baltymą, maksimaliai išsaugant sinergetinį abiejų terapinės paskirties baltymų aktyvumą.

5

Heterodimero pagal šį išradimą struktūroje N-galiniu partneriu buvo pasirinkta monomerinė pilnos sekos kamieninių ląstelių baltymo forma, o C-galiniu partneriu yra granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus monomerinė pilnos sekos forma. Tokia G-CSF ir SCF partnerių jungimo į heterodimerinę konstrukciją eilė pasiteisino, nes beveik visa SCF seka

10 (1-148) turi įtakos jo biologinei funkcijai. N-galinė G-CSF seka yra atsakinga už jo sąveiką su receptoriais.

Šios srities specialistams yra aišku, kad šiame išradime heterodimerinės konstrukcijos gali apimti G-CSF ir bet kurį kitą hematopoetinį faktorių, kuris veikia su G-CSF sinergetiškai.

15 Šalia to, šio išradimo būdu galima konstruoti G-CSF heterodimerines konstrukcijas, dalyvaujant bet kuriam augimo faktorių atstovui, atsižvelgiant į jų biologinės sąveikos su receptoriais ypatumus tam, kad kryptingai parinktume partnerių genetinio jungimo eiliškumą, t.y. nustatant kuris partneris užims N-galinio ir kuris C-galinio baltymo padėtį.

20 Pagrindiniai SCF-G-CSF heterodimerinio baltymo paruošimo ir kokybės kontrolės etapai pagal šį išradimą apima tokias stadijas:

- genetinės konstrukcijos paruošimas bei baltymo bakterinio kamieno-producento sukonstravimas.

- baltymo biosintezės, renatūracijos ir chromatografinio gryninimo proceso sukūrimas,
- proceso kontrolės metodų sukūrimas baltymo kokybės kontrolei,
- išgryninto baltymo formulavimo parinkimas jo ilgalaikiam saugojimui,
- 5 - baltymo apibūdinimas ir *in vitro* biologinis testavimas G-CSF proliferacijos teste,
- *in vivo* baltymo farmakokinetinių ir farmokodinaminių savybių nustatymas.

SCF ir G-CSF genų heterodimerinės formos buvo sukonstruotos sujungiant genų kopijas
 10 per linkerinę seką į vieną DNR fragmentą, kuris buvo įklonuotas į ekspresijos plazmidę (pavyzdžiui, pET-21b) ir, pavyzdžiui, į *E.coli* BL21(DE3) kamieną. Atrinktos kolonijos buvo kultivuojamos tinkamoje mitybinėje terpėje 37°C temperatūroje. Heterodimerinio baltymo biosintezė gautose kolonijose buvo indukuojama naudojant IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidą). Biomasės lizatas, gautas virinant su natrio dodecilsulfatu (SDS),
 15 buvo analizuojamas elektroforezės metodu.

Gautos heterodimerinio sulieto baltymo konstrukcijos pateiktos žemiau lentelėje 2.

Heterodimero genetinės konstrukcijos DNR sekos buvo patikrintos, nustatant pirminę nukleotidinę seką, kuri atitiko numatytą heterodimerinę seką, koduojančią abu
 20 rekombinantinius baltymus, sujungtus linkerine seka. Buvo pasirinkta linkerinė aminorūgščių seka su alfa-spiraliniais elementais EAAAK, kurie periodiškai pasikartoja nuo 2 iki 8 blokų.

Buvo rasta, kad naudojant jungiamąją linkerinę 54 aminorūgščių liekanų seką, kuri yra struktūrizuotos alfa-spiralės pavidalu, yra įmanoma atitolinti abu konstrukcijos partnerius
 25 tokiu atstumu, kuris neleidžia jiems tarpusavyje sąveikoti ir erdviškai trukdyti kiekvieno partnerio dalyvavimui sąveikoje su jo specifiniu receptoriu. Tokia heterodimerinė konstrukcija įgalina abu partnerius išreikšti savo biologinės funkcijos sinergetinį efektą, kuris gali vykti analogiškai nesujungtų partnerių kombinuotam naudojimui tirpale. Šalia to, sukurta heterodimerinė konstrukcija rodo ilgesnę gyvavimo *in vivo* trukmę nei SCF arba G-
 30 CSF monomerinės formos.

Heterodimerinės konstrukcijos aminorūgštinės sekos atitikimas teorinei genų koduojančiai sekai buvo patvirtintas nustatant išgryninto baltymo molekulinės masės atitikimą teorinei masių spektrometrijos metodu. Abiejų heterodimerinės konstrukcijos partnerių SCF ir G-

- CSF funkcionalumas buvo patvirtintas imunoblotingo metodu (Fig. 2) naudojant antikūnus, specifinius heterodimero SCF ir G-CSF daliai. Heterodimerinio baltymo grynumas ir jo kitimas sukurto gryninimo proceso stadijose pateiktas Fig. 1. Šalia to buvo nustatytas heterodimerinės konstrukcijos agregacijos laipsnis (Fig. 3) ir parodytas aukštas 98% G-
- 5 CSF-SCF sulieto baltymo monomerinės formos kiekis preparate. Išgryninto heterodimero substancija buvo suformuluota dviejuose buferinėse sistemose ir nustatytas stabilumas terminei denatūracijai (Fig. 4), kas leido pasirinkti natrio acetato formulavimo buferinę sistemą, tinkamą baltymo ilgalaikiam saugojimui ir *in vivo* studijoms. Heterodimero G-CSF dalies *in vitro* biologinio aktyvumo nustatymas naudojant proliferacijos testą su pelės
- 10 mieloidinės leukemijos ląstelių linija G-NFS-60 (13 pavyzdys) bei neutrofilų skaičiaus kitimas žiurkių modelinėje sistemoje (Fig. 5) patvirtina heterodimero struktūros korektiškumą ir baltymo biologinį aktyvumą. Be to G-CSF koncentracijos kitimas žiurkių kraujo serume parodo prailgintą heterodimerinio baltymo cirkuliacijos laiką *in vivo* (Fig. 6). Išgryninto baltymo substancija yra skiriama farmacinės kompozicijos sudarymui.
- 15 Pagal šį išradimą granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ir kamieninių ląstelių faktoriaus heterodimeras yra skiriamas gaminti farmacinę substanciją ir jos pagrindu sukurti farmacinę kompoziciją ir vaistinę formą gydant susirgimus tomis pačiomis sąlygomis ir indikacijoms, kuriomis naudojami monomeriniai G-CSF ir SCF baltymai arba jų abiejų kombinacija.
- 20 Todėl dar vienas svarbus šio išradimo objektas yra farmacinė kompozicija, kuri susideda iš terapinės efektyvios G-CSF ir SCF heterodimerinio baltymo dozės esant farmaciniams priedams, skiedikliui, ekscipientams ir pagalbinėms medžiagoms.
- Be išgryninto sulieto baltymo pagal šį išradimą terapiškai efektyvaus kiekio farmacinė
- 25 kompozicija gali būti papildomai komponuojama su sekančiais ingredientais:
- nešikliu, kuriuo gali būti naudojami monosacharidai (gliukozė, dekstrozė), disacharidai (sacharozė, fruktozė), polihidroksiliai alkoholiai (sorbitolis, manitolis);
 - buferine substancija reikiamai pH reikšmei sudaryti (acto, fosforo, citrinos rūgštys, Tris, Good'o buferinės substancijos);
 - 30 -druskų priedais kompozicijos izotoniškumo palaikymui (natrio chloridas, natrio bei amonio sulfatai);
 - detergentais, apsaugant baltymo substanciją nuo degradacijos ir inaktyvacijos fazių oras-skystis skiriamoje riboje (polisorbatai 20 ir 80, Pluronic šeimos atstovai);

- stabilizuojančiais agentais (polietilen-, polipropilenglikoliai, aminorūgštys Met, His, Asp, Arg, Gly);
- chelatuojančiais agentais (EDTA, EGTA, IDA);
- antimikrobiniais agentais (krezolis, benzilo alkoholis);
- 5 -SH-agentais (glutacionas, Cys, acetilcisteinas);
- kitomis pagalbinėmis medžiagomis.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

- 10 Toliau pateikiami konkretūs išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai. Jie neapriboja išradimo apimtys, o tiksliai iliustruoja išradimą.

1-5 pavyzdžiai

SCF-G-CSF heterodimerinio baltymo ekspresijos vektoriaus ir kamieno konstravimas

- 15 DNR sekos išradimo sulieto baltymo konstravimui buvo gautos naudojant sintetinius DNR fragmentus. Žmogaus SCF geno fragmentas buvo gautas su restriktazių NdeI ir Kpn2I taikiniiais atitinkamai fragmento 5' ir 3' galuose. Linkerinių sekų L2, L3, L5, L7, L_a fragmentai buvo gauti su Kpn2I ir BamHI restriktazių taikiniiais atitinkamai fragmento 5' ir 3' galuose. Žmogaus G-CSF geno fragmentas buvo gautas su restriktazių BamHI ir HindIII taikiniiais atitinkamai fragmento 5' ir 3' galuose (pastarajame koduojančios sekos 3' gale buvo įjungtas STOP kodonas). Kiekviena žemiau lentelėje 3 nurodyta seka buvo gauta sujungus SCF fragmentą su G-CSF fragmentu per atitinkamą linkerinę seką naudojant fermentą DNR ligazę. Po to fragmentai buvo paveikiami restriktazėmis NdeI ir HindIII bei įjungiami į ekspresijos plazmidę pET21b (Novagen) per tuos pačius taikinius. Gautų rekombinantinių plazmidžių DNR seka buvo sekvenuota ir atrinkti variantai su sekomis, pateiktomis lentelėje 3. Atrinktos plazmidės buvo transformuotos į bakterijų *E. coli* BL21(DE3) kamieną. Atrinktos kolonijos buvo kultivuojamos LB terpėje 37°C temperatūroje iki optinio tankio (OD_{600nm}) 0,8-1,2. Heterodimerinio baltymo biosintezė gautose kolonijose buvo indukuojama naudojant 0,5-1 mM IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidą), indukcijos laikas buvo 2,5-3 val. Biomasės lizatas, gautas virinant su 1% natrio dodecilsulfatu (SDS), buvo analizuojamas poliakrilamidinio gelio elektroforezės metodu.
- 20
- 25
- 30

Lentelė 3

Heterodimerinių baltymų genų seka

Pavyzdys Nr.	DNR sekos Nr. ir sulietas baltymas	Sulieto baltymo geno seka
1	SEQ ID NO: 11 SCF-L2-GCSF	ATGGAAGGGATCTGCCGTAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACTAAATTG GTGGCAAATCTTCCAAAAGACTACATGATCACCCCTCAAATATGTCCCGGGGATGGATGTT TTGCCAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTACAATTGTGACACAGCTTGACTGAT CTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAA CTTGTGAATATAGTCGATGACCTTGTGGAGTGCCTCAAAGAAAACCTCATCTAAGGATCTA AAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCCCGTCTCTTTACTCTGAAGAATTCTTTTCGTATT TTTAATCGTTCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAAACTAGTGATTGT GTGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGATTCCCGTGTCAAGTGTCAAAAACCATTT ATGTTACCCCTGTTGCAGCC TCCGGAGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGT GGATCCACACCTTTAGGACCTGCTAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAG CAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTAC AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCT CCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCAT AGCGGCCCTTTCTCTACAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATATCCCCGAGTTG GGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAG CAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCC TTCGCCTCTGCTTTCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCTAGCCATCTGCAGAGC TTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCGTAA
2	SEQ ID NO: 12 d SCF-L3-GCSF	ATGGAAGGGATCTGCCGTAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACTAAATTG GTGGCAAATCTTCCAAAAGACTACATGATCACCCCTCAAATATGTCCCGGGGATGGATGTT TTGCCAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTACAATTGTGACACAGCTTGACTGAT CTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAA CTTGTGAATATAGTCGATGACCTTGTGGAGTGCCTCAAAGAAAACCTCATCTAAGGATCTA AAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCCCGTCTCTTTACTCTGAAGAATTCTTTTCGTATT TTTAATCGTTCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAAACTAGTGATTGT GTGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGATTCCCGTGTCAAGTGTCAAAAACCATTT ATGTTACCCCTGTTGCAGCC TCCGGAGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GGATCCACACCTTTAGGACCTGCTAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAG CAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTAC AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCT CCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCAT AGCGGCCCTTTCTCTACAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATATCCCCGAGTTG GGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAG CAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCC TTCGCCTCTGCTTTCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCTAGCCATCTGCAGAGC TTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCGTAA
3	SEQ ID NO:13 SCF-L5-GCSF	ATGGAAGGGATCTGCCGTAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACTAAATTG GTGGCAAATCTTCCAAAAGACTACATGATCACCCCTCAAATATGTCCCGGGGATGGATGTT TTGCCAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTACAATTGTGACACAGCTTGACTGAT CTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAA CTTGTGAATATAGTCGATGACCTTGTGGAGTGCCTCAAAGAAAACCTCATCTAAGGATCTA AAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCCCGTCTCTTTACTCTGAAGAATTCTTTTCGTATT TTTAATCGTTCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAAACTAGTGATTGT GTGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGATTCCCGTGTCAAGTGTCAAAAACCATTT ATGTTACCCCTGTTGCAGCC TCCGGAGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGT GGATCCACACCTTTAGGACCTGCTAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAG CAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTAC AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCT CCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCAT AGCGGCCCTTTCTCTACAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATATCCCCGAGTTG GGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAG CAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCC TTCGCCTCTGCTTTCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCTAGCCATCTGCAGAGC TTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCGTAA
4	SEQ ID NO:14 SCF-L7-GCSF	ATGGAAGGGATCTGCCGTAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACTAAATTG GTGGCAAATCTTCCAAAAGACTACATGATCACCCCTCAAATATGTCCCGGGGATGGATGTT TTGCCAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTACAATTGTGACACAGCTTGACTGAT CTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAA CTTGTGAATATAGTCGATGACCTTGTGGAGTGCCTCAAAGAAAACCTCATCTAAGGATCTA AAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCCCGTCTCTTTACTCTGAAGAATTCTTTTCGTATT TTTAATCGTTCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAAACTAGTGATTGT GTGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGATTCCCGTGTCAAGTGTCAAAAACCATTT ATGTTACCCCTGTTGCAGCC TCCGGAGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGT GGATCCACACCTTTAGGACCTGCTAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAG CAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTAC AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCTGGGCT CCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCAT AGCGGCCCTTTCTCTACAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATATCCCCGAGTTG GGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAG CAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCC TTCGCCTCTGCTTTCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCTAGCCATCTGCAGAGC TTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCGTAA

		GTGGTTTCTTCAACATTAAAGTCCTGAGAAAGATTCCCGTGTCAGTGTACAAAACCATTT ATGTTACCCCTGTTCGAGCC TCCGGAGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGT GGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGT GGATCCACACCTTTAGGACCTGCTAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCTGTCTCAAGTGCTTAGAG CAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTAC AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCGGGGCT CCCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCCAT AGCGGCCCTTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATATCCCCGAGTTG GGTCACCTTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAG CAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCC TTCGCCTCTGCTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCTAGCCATCTGCAGAGC TTCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCAGCGCCG
5	SEQ ID NO: 15 SCF-L α -GCSF	CATATGGAAGGGATCTGCCGTAATCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACATAAATG GTGGCAAATCTTCCAAAGACTACATGATCACCCCTCAAATATGTCGGGGGATGGATGTT TTGCCAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTACAATTGTGACACAGCTTGACTGAT CTCTTGACAAAGTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCATCATAGACAAA CTTGTGAATATAGTCGATGACCTTGTGGAGTGCGTCAAAGAAAACCTCATCTAAGGATCTA AAAAAATCATTCAAGAGCCCAGAACCCGCTCTTTTACTCCTGAAGAATTCTTTCTGATT TTTAATCGTTCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTAGTGGCATCTGAAACTAGTGATTGT GTGGTTTCTTCAACATTAAAGTCCTGAGAAAGATTCCCGTGTCAGTGTACAAAACCATTT ATGTTACCCCTGTTCGAGCC TCCGGACTTGAGGCTGAAGCAGCAGCTAAAGAAGCAGCA GCTAAAGAAGCAGCAGCTAAAGAAGCAGCAGCTAAAGCTCTCGAGGCTGAAGCAGCAGCT AAAGAAGCAGCAGCTAAAGAAGCAGCAGCTAAAGAAGCAGCAGCTAAAGCTCTTGAGGGA TCACACCTTTAGGACCTGCTAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCTGTCTCAAGTGCTTAGAG CAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTAC AAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCGGGGCT CCCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCCAT AGCGGCCCTTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATATCCCCGAGTTG GGTCACCTTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAG CAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCCCTGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCC TTCGCCTCTGCTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCTAGCCATCTGCAGAGC TTCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCAGCGCCGTAATAAGCTT

Tinkami įvairūs DNR sekos variantai, kurie koduoja kiekvieno iš heterodimerinės konstrukcijos partnerių natyvaus baltymo aminorūgščių seką arba seką, identiška bent 95%.

- 5 Toliau sekančiuose pavyzdžiuose SCF-GCSF heterodimeras reiškia SCF ir G-CSF sulietą baltymą pagal išradimą, turintį linkerinę seką L α , t. y. sulietą baltymą, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID Nr: 10 (Lentelė 2).

6 pavyzdys

10 SCF-G-CSF heterodimerinio baltymo biosintezė

SCF-G-CSF producentas E.coli BL21(DE3) pET21b-SCF-GCSF-L α buvo auginamas kolbose ir/arba fermentoriuje.

Pirminiam inokuliatui naudota 60 ml LB (*MO BIO laboratories, Inc.*) terpės 250 ml kolboje. Ampicilino (*Roth*) koncentracija 100 mg/l. Kolbos laikomos kratytuve prie +37°C su 220

- 15 rpm maišymu. Po nakties (~16 val.) kultūra perkeliama į 5 l fermentatorių (*Sartorius AG*) su 3 l efektyviu tūriu (2% v/v inokuliacija). Fermentacijai naudojama terpė: 11,28 g/l M9 druskos (*Sigma*); 5 g/l mielių ekstraktas (*Fluka*). Priedai, kurie yra sterilinami atskirai ir aseptiškai pridedami po pagrindinės terpės sterilizacijos: 4 g/l gliukozės; 1 g/l MgSO₄

(*Sigma*); 100 mg/l ampicilino. Fermentacijos atliktos esant tokioms sąlygoms: temperatūra palaikoma ties +37°C; pH buvo automatiškai palaikoma ties 6,8, naudojant 1M NaOH ir 1M HCl; ištirpusio deguonies kiekis buvo palaikomas ties ~20% keičiant oro padavimo greitį ir maišymo greitį. Kai optinio tankio vertė prie 600 nm ilgio bangų (OD600) pasiekia 1,3 –

- 5 1,6, pridedama IPTG (izopropil-β-D-tio-galaktopiranozidas) indukuoti tikslinio baltymo biosintzei. Galutinė IPTG koncentracija 1 mM. Kultūra fermentatoriuje auginama 2 val. po indukcijos. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 30 min 3500 - 4000 rpm greičiu esant 4°C. Biomasė laikoma užšaldyta -20°C.

SCF-G-CSF heterodimero ekspresijos lygis biomasėje – $20,95 \pm 3,45$ %.

10

7 pavyzdys

SCF-G-CSF heterodimero intarpinių kūnelių išskyrimas iš *E.coli* ląstelių

- 12 g užšaldytos *E.coli* biomasės homogenizuojama 240 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0), 5 mM EDTA buferiniame tirpale. Į homogenizatą pridedama 0,24 g lizocimo, 0,24 ml Triton X-
- 15 100, 2,4 ml 100 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) tirpalo etanolyje ir 1,68 ml 2-merkaptioetanolio (galutinė koncentracija tirpale 100 mM). Homogenizatas maišomas 30 minučių kambario temperatūroje ant magnetinės maišyklės. Tada veikiamas ultragarsu 10 minučių (22 kHz) ledo vonioje ir centrifuguojamas *Beckman* centrifuga 14000 rpm, 25 minutes. Skystis nupilamas, nuosėdos du kartus plaunamos homogenizuojant 240 ml 1 M
- 20 NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1% polisorbato 80 tirpale ir vieną kartą – 240 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Po kiekvieno homogenizavimo gauta suspensija centrifuguojama *Beckman* centrifuga 14000 rpm, 25 minutes.

8 pavyzdys

- 25 **SCF-G-CSF heterodimero intarpinių kūnelių tirpinimas redukuojančiomis sąlygomis**
Iš 12 g biomasės išskirti intarpiniai kūneliai tirpinami 120 ml 8 M karbamido, 50 mM Tris-HCl, 0,5 mM DTT, pH 8,0 (+4°C) buferiniame tirpale. Tirpinama 2 valandas maišant ant magnetinės maišyklės +4°C temperatūroje. Po tirpinimo tirpalas centrifuguojamas *Beckman* centrifuga 14000 rpm 25 minutes.

30

9 pavyzdys

SCF-G-CSF heterodimero renatūracija

Po intarpinių kūnelių tirpinimo 8 M karbamido tirpale, baltymo tirpalas (185 mg baltymo) skiedžiamas iki 2 M karbamido tirpalo. Renatūracija vykdoma 2 M karbamido, 50 mM Tris-

HCl, 0,125 mM DTT, 0,625 mM oksiduoto glutationo (GSSG) pH 8,0 (+4°C)) tirpale 24 val. maišant ant magnetinės maišyklės +4°C temperatūroje. Po renatūracijos tirpalas centrifuguojamas *Beckman* centrifuga 14000 rpm 25 minutes.

5 10 pavyzdys

SCF-G-CSF heterodimero anijonų-mainų chromatografija naudojant DEAE- Sefarozės FF sorbentą

Baltymo gryninimas atliekamas kambario temperatūroje naudojant kolonėlę, užpildytą anijonitu DEAE-Sefarozė (DEAE-Sepharose Fast Flow) bei chromatografinę sistemą

10 ÄKTA Purifier.

Stiklo kolonėlė (XK 26 arba XK 16/20, „GE Healthcare“) užpildoma 60 ml DEAE-Sefarozės sorbentu, prijungiama prie ÄKTA *Purifier* gryninimo sistemos ir nupusiausvyrinama 50 mM Tris-HCl 7,5 buferiniu tirpalu. Baltymo tirpalas po renatūracijos (bendras kiekis 185 mg, turintis 27% pagrindinės heterodimero formos, kuri kontroliuojama RP-HPLC analize))

- 15 įvedamas į kolonėlę 5 ml/min greičiu. Nesorbuoto baltymo pašalinimui kolonėlė plaunama 5 kolonėlės tūriais 50 mM Tris-HCl 7,5 buferinio tirpalo 3 ml/min greičiu. Renkamos frakcijos po 15 ml. Chromatografijos metu UV detektoriumi stebimas eliuato optinis tankis ties 280 nm, 254 nm ir 215 nm. Baltymas desorbuojamas iš kolonėlės keičiant eliuento joninę jėgą – laipsniškai (4 lentelė) didinant NaCl koncentraciją kolonėlėje nuo 0 M iki 0,5
- 20 M (per 8 kolonėlės tūrius). Tirpalų tekėjimo greitis kolonėlėje 3 ml/min.

Lentelė 4

Laiptinė eliucija per DEAE-Sefarozės kolonėlę

Laiptelio Nr.	Eliuento koncentracija	Kolonėlės tūrių skaičius
1	20% (0,1 M NaCl)	1
2	30% (0,15 M NaCl)	1
3	40% (0,2 M NaCl)	1
4	50% (0,25 M NaCl)	1
5	100% (0,5 M NaCl)	4

- 25 Renkamos baltymo eliuato frakcijos (po 10 ml), kuriose Bradfordo metodu nustatoma baltymo koncentracija frakcijose. Baltymų frakcijų mėginiai analizuojami RP-HPLC chromatografijos metodu. Baltymo frakcijos su didžiausiu taisyklingos formos kiekiu sujungiamos ir užnešamos ant sekančios kolonėlės.

Pabaigus gryninti baltymą sorbentas kolonėlėje yra regeneruojamas.

30

11 pavyzdys

SCF-G-CSF heterodimero chromatografija naudojant mišraus veikimo CHT hidroksiapatito sorbentą

Toliau baltymo gryninimas atliekamas kambario temperatūroje naudojant sorbentą hidroksiapatitą CHT (CHT™ Ceramic Hydroxyapatite).

- 5 Stiklo kolonėlė (XK 16/20, „GE Healthcare“) užpildoma 18 ml CHT hidroksiapatito sorbentu, prijungiama prie ÄKTA *Purifier* chromatografinės sistemos ir nupusiausvyrinama 50 mM Tris-HCl pH 7,2 buferiniu tirpalu. Baltymo tirpalas po chromatografijos per DEAE Sefarozę (18 mg baltymo, kuriame pagrindinės heterodimero formos kiekis yra 63%) įvedamas į kolonėlę 3 ml/min greičiu. Nesorbuotas baltymas išplaunamas 5 kolonėlės
 - 10 tūriais 5 mM NaH₂PO₄, 0,1 M NaCl pH 7,2 buferinio tirpalo 3 ml/min greičiu. Renkamos frakcijos po 10 ml. Chromatografijos metu UV detektoriumi stebimas eliuato optinis tankis ties 280 nm, 254 nm ir 215 nm. Baltymas desorbuojamas iš kolonėlės keičiant eliuento joninę jėgą – laipsniškai didinant NaH₂PO₄ koncentraciją kolonėlėje nuo 5 mM iki 0,5 M (per 10 kolonėlės tūrių). Tirpalų tekėjimo greitis kolonėlėje 3 ml/min. Renkamos frakcijos
 - 15 po 5 ml ir jose Bradfordo metodu nustatoma baltymo koncentracija ir frakcijų mėginiai analizuojami RP-HPLC chromatografijos metodu.
- Iš kolonėlės visi likę sorbuoti baltymai pašalinami, leidžiant 5 kolonėlės tūrius 0,5 M NaH₂PO₄ pH 7,0 buferinio tirpalo.

20 **12 pavyzdys**

SCF-G-CSF heterodimero katijonų-mainų chromatografija naudojant SP-Sefarozės FF sorbentą

- Pabaigoje atliekamas baltymo gryninimas atliekamas kambario temperatūroje naudojant katijonitu SP-Sefaroze (SP-Sepharose Fast Flow) užpildytą kolonėlę XK 16/20, „GE
- 25 Healthcare“, 8 ml sorbento). Kolonėlė prijungiama prie ÄKTA *Purifier* chromatografinės sistemos ir nupusiausvyrinama 20 mM Na acetato pH 4,7 buferiniu tirpalu. Baltymo tirpalas po chromatografijos per hidroksiapatitą CHT (5 mg baltymo, kuriame 77% pagrindinės heterodimero formos) įvedamas į kolonėlę 3 ml/min greičiu. Kolonėlė plaunama 5 kolonėlės tūriais 20 mM Na acetato pH 4,7 buferiniu tirpalu 3 ml/min greičiu. Renkamos
 - 30 frakcijos po 5 ml. Chromatografijos metu UV detektoriumi stebimas eliuato optinis tankis ties 280 nm, 254 nm ir 215 nm. Baltymas desorbuojamas iš kolonėlės keičiant eliuento joninę jėgą – laipsniškai didinant NaCl koncentraciją kolonėlėje nuo 0 M iki 0,5 M (per 10 kolonėlės tūrių). Tirpalų tekėjimo greitis kolonėlėje 3 ml/min. Renkamos frakcijos po 3 ml.

Bradfordo metodu nustatoma baltymo koncentracija frakcijose. Baltymų frakcijų mėginiai analizuojami RP-HPLC chromatografijos metodu.

Pabaigus gryninti baltymą sorbentas kolonėlėje yra regeneruojamas.

- Po galutinės chromatografijos stadijos, apjungtos baltymo frakcijos sukonzentruojamos iki
 5 1 mg/ml ir pervedamos į saugojimo buferinį tirpalą (20 mM acto rūgštis pH 4,0 diafiltracijos būdu naudojant filtruojančius centrifuginius mėgintuvėlius Amicon® Ultra-15. Po to tirpalas filtruojamas per 0,22 µm *MustangE* filtrą, sulaikantį endotoksinus. Išgrynintas baltymo tirpalas Na acetato buferiniame tirpale laikomas +4°C temperatūroje.

10 13 pavyzdys

SCF-G-CSF heterodimero *in vitro* biologinis testavimas

- Biologiniam SCF-G-CSF *in vitro* aktyvumo nustatymui buvo naudojama G-NFS-60 ląstelių linija RPMI 1640 augimo terpėje [Weinstein Y, Ihle JN, Lavu S, Reddy EP, Truncation of the *c-myc* gene by retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, vol. 83, p. 5010-5014]. Aktyvus G-CSF baltymas skatina šios ląstelių linijos proliferaciją po sąveikos su G-CSF receptoriais ant šių ląstelių paviršiaus. Biologinio aktyvumo nustatymui ląstelės G-NFS-60 kultivuojamos 96 šulinėlių plokštelėse 48-72 val., pridėjus į augimo terpę skirtingus kiekius (0,1-10 ng/ml) tiriamojo G-CSF baltymo pavyzdžio. Kontrolei naudojamas Neupogen™ (veiklioji
 15 medžiaga Filgrastim), kurio biologinis aktyvumas yra žinomas (100 mln. TV/mg). Ląstelių proliferacija įvertinama kolorimetriniu metodu, naudojant MTS dažą. Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas G-CSF biologiniam aktyvumui. Nustatytas SCF-G-CSF heterodimero biologinis aktyvumas yra 14,95±3,88 mln.TV/mg.

14 pavyzdys

- 25 **Heterodimero biologinės funkcijos testavimas *in vivo* žiurkių modelinėse sistemose**
 Farmakokinekinų ir farmakodinaminių SCF-G-CSF heterodimero parametrų nustatymui buvo naudotos *Wistar* klono 4 mėn. amžiaus moteriškos lyties žiurkės, kurių svoris svyravo nuo 200 iki 220g. Farmakokinekiniam baltymų vertinimui eksperimentiniai gyvūnai buvo suskirstyti į grupes, kiekvienoje iš jų buvo po 3-5 žiurkes. Tiriamieji ir kontroliniai
 30 baltymai buvo sušvirkšti po oda. Naudotos tokios tiriamojo SCF-G-CSF heterodimerinio baltymo koncentracijos: 500 ir 1000 µg/kg (gyvūno kūno svorio). Kontrolei naudotas G-CSF preparatas Tevagrastim™ ir laboratorijoje išskirtas ir išgrynintas SCF, bei abiejų baltymų mišinys tomis pačiomis baltymo koncentracijomis skaičiuojant gyvūno kūno svoriui. Rekombinantinių baltymų koncentracijų testavimui kraujo serumas iš gyvūnų buvo

rinktas po 3, 6 ir 18 valandų po poveikio tiriamaisiais ar kontroliniais baltymais. Tuo tikslu iš žiurkės uodegos venos buvo paimta apie 0,8-1,0 ml kraujo, kuris 1 – 1,5 val. inkubuotas kambario temperatūroje, po to 12 val. – šaldytuve (4°C). Serumo atskyrimui mėginiai buvo centrifuguoti 15 min. 1500 rpm kambario temperatūroje, iš kiekvieno mėgintuvėlio serumas

5 surinktas į 2-3 sterilius mėgintuvėlius ir užšaldytas šaldiklyje (-80°C).

Prieš eksperimento pradžią ir po 24, 48 bei 72 val. nuo poveikio pradžios buvo atlikti gyvūnų kraujo tyrimai, panaudojant kraujo analizatorių *Hemavet 950*. Buvo stebimas farmakodinaminis rekombinantinių baltymų poveikis analizuojant kraujo neutrofilų (granulocitų) skaičiaus dinamiką. Tam iš žiurkės uodegos venos buvo paimta po 20 µl

10 kraujo, kuris sumaišytas su 5 µl 7,5 % EDTA, inkubuotas 10 min. ir analizuotas minėtu aparatu. Analizės duomenys pateikti Fig. 5.

Kraujo serumo mėginiai buvo testuoti naudojant kompanijos *PepruTech* žmogaus G-CSF baltymo nustatymo rinkinius (Human G-CSF ELISA Development Kit), skirtus analizei ELISA metodu. Analizės duomenys pateikti Fig. 6.

15

Iš grafiko Fig. 5 matyti, kad po SCF-G-CSF heterodimero injekcijos neutrofilų skaičius buvo didesnis už monomerinio G-CSF esant jo 500 µg/kg ir 1000 µg/kg dozėms. Lyginant su monomerų mišiniu, SCF-G-CSF heterodimero atveju didesnis neutrofilų skaičius buvo po 48 val., kas leidžia teigti, kad heterodimeras veikia ilgiau nei monomerai mišinyje. SCF

20 ir G-CSF monomerų mišinio veikimas individualių baltymų SCF ir G-CSF atžvilgiu rodo abiejų baltymų sinergetinį veikimą. Tokį patį efektą sukelia ir abiejų baltymų heterodimerinė forma, patvirtindama naujos baltymo struktūros (heterodimerinio SCF-GCSF) sinergetinio veikimo faktą. Tai akivaizdus tokios baltymų konstrukcijos naudojimo terapijai privalumas, nes nebūtina naudoti abiejų baltymų registruotas vaistines formas - geriau kurti lygiavertę veikimo heterodimerines konstrukcijas.

25

Fig. 6 pateikti rezultatai rodo, kad heterodimerinės baltymo formos kitimas laike skiriasi nuo G-CSF monomerinės formos kitimo. Pastarosios koncentracija po 6 val. nukrenta daugiau nei dvigubai, kai tuo tarpu heterodimero atveju jos lygis per tą patį laiką pakyla daugiau nei 2 kartus. Skirtingai nuo G-CSF, SCF-G-CSF heterodimerinė forma išlieka

30 serume ir po 18 val., t.y. išsilaikymas kraujyje pailgėja bent 3 kartus lyginant su G-CSF monomeru (Tevagrastim™).

Taigi, heterodimerui pagal siūlomą išradimą stebimas jo cirkuliacijos serume pailgintas veikimas. Tokiu būdu, pavyko pasiekti, kad tinkamai sulietų dviejų baltymų konstrukcija

pasižymi ilgesne cirkuliacijos serume trukme ir gali *in vivo* atlikti tą patį vaidmenį, kaip monomerinių nemodifikuotų baltymų mišinys.

- Siūlomame išradime cirkuliacijos trukmės pailgėjimas pasiekiamas tiek didinant heteromultimerinės konstrukcijos molekulinę masę, tiek tinkamai parenkant partnerių jungimo tvarką ir linkerinės sekos ilgį ir jos struktūrą.

Tiek sukurta heteromultimerinės (heterodimerinės) konstrukcijos struktūra, tiek ir sulieto baltymo gavimo, išskyrimo ir gryninimo sąlygų visumos parinkimas ir suderinimas patvirtina, kad heteromultimerinės konstrukcijos ekvivalentinis kiekis išreikš *in vivo* sinergetinį veikimą panašiai kaip ir abiejų partnerių kombinuotas veikimas.

10

Pramoninis pritaikomumas

Išradimas turi plačias terapinio panaudojimo galimybes.

SEKŲ SĄRAŠAS

<110> UAB Profarma
 <120> Granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus sulieti baltymai su kitais augimo
 5 faktoriais, optimaliai su kamieninių ląstelių faktoriumi, ir jų gavimo būdas
 <130> 2084
 <160> 15
 <170> Patentln versija 3.5

10 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 15 <223> Linkerio seka
 <400> 1

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

20

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Dirbtinė seka
 25 <220>
 <223> Linkerio seka
 <400> 2

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

30 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 26
 <212> PRT
 35 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Linkerio seka
 <400> 3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

40 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 4

- <211> 36
 <212> PRT
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 5 <223> Linkerio seka
 <400> 4

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser
 35

- 15 <210> 5
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 20 <223> Linkerio seka
 <400> 5

Ser Gly Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu
 1 5 10 15
 25 Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala
 20 25 30
 Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ala Leu Glu Gly Ser
 30 50

- <210> 6
 <211> 351
 <212> PRT
 35 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Heterodimerinis baltymas
 <400> 6

40 Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val
 1 5 10 15

Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys
 20 25 30
 Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu
 35 40 45
 5 Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe
 50 55 60
 Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 10 85 90 95
 Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr
 100 105 110
 Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys
 115 120 125
 15 Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr
 130 135 140
 Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 165 170 175
 Ser Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 180 185 190
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 195 200 205
 25 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 210 215 220
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
 30 245 250 255
 Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
 275 280 285

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
 290 295 300
 Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 305 310 315 320
 5 Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 325 330 335
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 340 345 350

 10 <210> 7
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 15 <223> Heterodimerinis baltymas
 <400> 7

 Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val
 1 5 10 15
 20 Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys
 20 25 30
 Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu
 35 40 45
 Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe
 25 50 55 60
 Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 85 90 95
 30 Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr
 100 105 110
 Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys
 115 120 125
 Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr
 35 130 135 140
 Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met
 145 150 155 160

Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 165 170 175
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro
 180 185 190
 5 Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly
 195 200 205
 Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys
 210 215 220
 His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp
 10 225 230 235 240
 Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys
 245 250 255
 Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln
 260 265 270
 15 Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu
 275 280 285
 Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu
 290 295 300
 Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro
 20 305 310 315 320
 Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala
 325 330 335
 Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
 340 345 350
 25 Leu Ala Gln Pro
 355

 <210> 8
 <211> 366
 30 <212> PRT
 <213> Dirbtinė sėka
 <220>
 <223> Heterodimerinis baltymas
 <400> 8
 35
 Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val
 1 5 10 15

Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys
 20 25 30
 Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu
 35 40 45
 5 Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe
 50 55 60
 Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 10 85 90 95
 Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr
 100 105 110
 Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys
 115 120 125
 15 Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr
 130 135 140
 Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 165 170 175
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 180 185 190
 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 195 200 205
 25 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 210 215 220
 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 30 245 250 255
 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 260 265 270
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 275 280 285

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
 290 295 300
 Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
 305 310 315 320
 5 Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
 325 330 335
 Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
 340 345 350
 Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 10 355 360 365

 <210> 9
 <211> 376
 <212> PRT
 15 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Heterodimerinis baltymas
 <400> 9

 20 Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val
 1 5 10 15
 Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys
 20 25 30
 Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu
 25 35 40 45
 Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe
 50 55 60
 Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 30 Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 85 90 95
 Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr
 100 105 110
 Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys
 35 115 120 125
 Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr
 130 135 140

Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 165 170 175
 5 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 180 185 190
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Pro Leu Gly Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg
 10 210 215 220
 Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr
 225 230 235 240
 Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu
 245 250 255
 15 Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln
 260 265 270
 Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln
 275 280 285
 Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr
 20 290 295 300
 Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp
 305 310 315 320
 Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln
 325 330 335
 25 Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly
 340 345 350
 Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg
 355 360 365
 Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 30 370 375

<210> 10
 <211> 394
 <212> PRT
 35 <213> Dirbtinė seka
 <220>

<223> Heterodimerinis baltymas

<400> 10

Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val
 5 1 5 10 15
 Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys
 20 25 30
 Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu
 35 40 45
 10 Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe
 50 55 60
 Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 15 85 90 95
 Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr
 100 105 110
 Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys
 115 120 125
 20 Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr
 130 135 140
 Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met
 145 150 155 160
 Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Gly Leu Glu Ala Glu Ala Ala Lys
 25 165 170 175
 Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Ala
 180 185 190
 Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala
 195 200 205
 30 Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Gly Ser Thr Pro Leu Gly
 210 215 220
 Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln
 225 230 235 240
 Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys
 35 245 250 255

Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His
 260 265 270
 Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala
 275 280 285
 5 Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu
 290 295 300
 Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly
 305 310 315 320
 Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr
 10 325 330 335
 Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro
 340 345 350
 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala
 355 360 365
 15 Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 385 390

20

<210> 11
 <211> 1056
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 25 <220>
 <223> Koduojanti seka
 <400> 11

atggaaggga tctgccgtaa tcgtgtgact aataatgtaa aagacgtcac taaattgggtg 60
 30 gcaaattctc caaaagacta catgatcacc ctcaaatacg tcccggggat ggatgttttg 120
 ccaagtcatt gttggataag cgagatggta gtacaattgt cagacagctt gactgatctt 180
 ctggacaagt ttcaaatat ttctgaaggc ttgagtaatt attccatcat agacaaactt 240
 gtgaatatag tcgatgacct tgtggagtgc gtcaaagaaa actcatctaa ggatctaaaa 300
 aaatcattca agagcccaga accccgtctc ttactcctg aagaattctt tcgtattttt 360
 35 aatcgttcca ttgatgcctt caaggacttt gtagtggcat ctgaaactag tgattgtgtg 420
 gtttctcaa cattaagtcc tgagaaagat tcccggtgca gtgtcacaaa accatttatg 480
 ttacccctg ttgcagcctc cggaggtggg ggttctgggt gtggtggatc cacaccttta 540

ggacctgcta gctccctgcc ccagagcttc ctgctcaagt gcttagagca agtgaggaag 600
 atccagggcg atggcgagc gctccaggag aagctgtgtg ccacctacaa gctgtgccac 660
 cccgaggagc tgggtctgct cggacactct ctgggcatcc cctgggctcc cctgagctcc 720
 tgccccagcc aggccctgca gctggcaggc tcttgagcc aactccatag cggccttttc 780
 5 cttaccagg ggctcctgca ggccctggaa gggatatccc ccgagttggg tcccaccttg 840
 gacacactgc agctggacgt gcgcgacttt gccaccacca tctggcagca gatggaagaa 900
 ctgggaatgg cccctgccct gcagcccacc cagggtgcca tgcgggcctt cgcctctgct 960
 ttccagcgcc gggcaggagg ggtcctgggt gctagccatc tgcagagctt cctggagggt 1020
 tcgtaccgag ttctacgcca ccttgcgcag ccgtaa 1056

10

<210> 12
 <211> 1071
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka

15

<220>
 <223> Koduojanti seka
 <400> 12

atggaaggga tctgccgtaa tctgtgact aataatgtaa aagacgtcac taaattggtg 60
 gcaaatttc caaaagacta catgacacc ctcaaatacg tcccggggat ggaattttg 120
 20 ccaagtcatt gttggataag cgagatggtg gtacaattgt cagacagctt gactgatctt 180
 ctggacaagt ttcaaatat ttctgaaggc ttgagtaatt attccatcat agacaaactt 240
 gtgaatatag tcgatgacct tgtggagtgc gtcaaagaaa actcatctaa ggatctaaaa 300
 aaatcattca agagcccaga acccgtctc ttactcctg aagaattctt tcgtattttt 360
 aatcgtcca ttgatgcctt caaggacttt gtatggcat ctgaaactag tgattgtgtg 420
 25 gtttctcaa cattaagtcc tgagaaagat tcccggtgca gtgtcacaaa accatttatg 480
 ttacccctg ttgcagcctc cggagggtgt ggttctggtg gtggtggtc tgggtggtgt 540
 ggatccacac ctttaggacc tgctagctcc ctgcccaga gcttctgct caagtgccta 600
 gagcaagtga ggaagatcca gggcgatggc gcagcgctcc aggagaagct gtgtgccacc 660
 tacaagctgt gccacccga ggagctggtg ctgctcggac actctctggg catcccctgg 720
 30 gctccctga gctcctgcc cagccaggcc ctgcagctgg caggctgctt gagccaactc 780
 catagcggcc tttcctcta ccaggggctc ctgcaggccc tggaagggat atcccccgag 840
 ttgggtccca ccttgacac actgcagctg gacgtcgccg acttgccac caccatctgg 900
 cagcagatgg aagaactggg aatggccctt gccctgcagc ccaccagggt tgccatgccg 960
 gccttgcct ctgctttcca gcgccgggca ggaggggtcc tgggtgctag ccatctgcag 1020
 35 agcttctggt aggtgtcgta ccgcgttcta cgccaccttg cgcagccgta a 1071

- <210> 13
 <211> 1101
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 5 <220>
 <223> Koduojanti seka
 <400> 13

atggaaggga tctgccgtaa tcgtgtgact aataatgtaa aagacgtcac taaattggtg 60
 10 gcaaattctc caaaagacta catgatcacc ctcaaatacg tcccggggat ggatgttttg 120
 ccaagtcatt gttggataag cgagatggta gtacaattgt cagacagctt gactgatctt 180
 ctggacaagt ttcaaatat ttctgaaggc ttgagtaatt attccatcat agacaaactt 240
 gtgaatatag tcgatgacct tgtggagtgc gtcaaagaaa actcatctaa ggatctaaaa 300
 aaatcattca agagcccaga acccgcctc ttactcctg aagaattctt tcgtattttt 360
 15 aatcgtcca ttgatgcctt caaggacttt gtagtggcat ctgaaactag tgattgtgtg 420
 gtttctcaa cattaagtcc tgagaaagat tcccggtca gtgcacaaa accatttatg 480
 ttacccccctg ttgcagcctc cggaggtggt ggttctggtg gtggtggttc tgggtggtgt 540
 ggttctggtg gtggtggttc tgggtggtgt ggatccacac cttaggacc tgctagctcc 600
 ctgccccaga gcttctgct caagtgccta gagcaagtga ggaagatcca gggcgatggc 660
 20 gcagcgctcc aggagaagct gtgtgccacc tacaagctgt gccaccccca ggagctggtg 720
 ctgctcggac actctctggg catccccctg gctccccga gctcctgcc cagccaggcc 780
 ctgcagctgg caggctgctt gagccaactc catagcggcc ttctctcta ccaggggctc 840
 ctgcaggccc tggaagggtat atccccgag ttgggtccca ccttgacac actgcagctg 900
 gacgtcgccg actttgccac caccatctgg cagcagatgg aagaactggg aatggcccct 960
 25 gccctgcagc ccaccaggg tgccatgccg gccttcgct ctgcttcca gcgccgggca 1020
 ggaggggtcc tgggtgctag ccatctgcag agcttctgg aggtgtcgta ccgcgttcta 1080
 cgccacctg cgcagccgta a 1101

- <210> 14
 30 <211> 1128
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Koduojanti seka
 35 <400> 14

atggaaggga tctgccgtaa tcgtgtgact aataatgtaa aagacgtcac taaattggtg 60
 gcaaattctc caaaagacta catgatcacc ctcaaatacg tcccggggat ggatgttttg 120
 ccaagtcatt gttggataag cgagatggta gtacaattgt cagacagctt gactgatctt 180
 40 ctggacaagt ttcaaatat ttctgaaggc ttgagtaatt attccatcat agacaaactt 240

gtgaatatag tcgatgacct tgggagtg gcacaaagaa actcatctaa ggatctaaaa 300
 aaatcattca agagcccaga accccgtctc ttactcctg aagaattctt tcgtattttt 360
 aatcgttcca ttgatgcctt caaggacttt gtagtggcat ctgaaactag tgattgtgtg 420
 gtttctcaa catlaagtcc tgagaaagat tcccggtgca gtgtcacaaa accatttatg 480
 5 ttacccctg ttgcagcctc cggagggtgt ggttctggtg gtggtggttc tgggtgtgtt 540
 ggttctggtg gtggtggttc tgggtgtgtt ggttctggtg gtggtggttc tgggtgtgtt 600
 ggatccacac ctttaggacc tgctagctcc ctgcccaga gcttctgct caagtgttta 660
 gagcaagtga ggaagatcca gggcgatggc gcagcgctcc aggagaagct gtgtgccacc 720
 tacaagctgt gccaccccga ggagctgggt ctgctcgac actctctggg catcccctgg 780
 10 gctcccctga gctcctgccc cagccaggcc ctgcagctgg caggctgctt gagccaactc 840
 catagcggcc ttctctcta ccaggggctc ctgcaggccc tggaaggat atccccgag 900
 ttgggtcca ccttgacac actgcagctg gacgtcgccg acttgccac caccatctgg 960
 cagcagatgg aagaactggg aatggccct gccctgcagc ccaccagggt tgccatgccg 1020
 gccttcgct ctgcttcca gcgcccggca ggaggggtcc tgggtgtag ccatctgcag 1080
 15 agcttctggt aggtgtcgt cgcgttcta cgccacctg cgcagccg 1128

<210> 15

<211> 1195

<212> DNR

20 <213> Dirbtinė seka

<220>

<223> Koduojanti seka

<400> 15

25 catatggaag ggatctgccg taatcgtgtg actaataatg taaaagacgt cactaaattg 60
 gtggcaaact ttccaaaaga ctacatgac accctcaa atgtcccggg gatggatgtt 120
 ttgcaagtc attgtggat aagcgagatg gtagtacaat tgcagacag cttgactgat 180
 cttctggaca agttttcaaa ttttctgaa ggcttgagta attattccat catagacaaa 240
 cttgtgaata tagtcgatga cttgtggag tgcgtcaaag aaaactcact taaggatcta 300
 30 aaaaaatcat tcaagagccc agaaccctgt ctcttactc ctgaagaatt cttctgtatt 360
 tttaatcgtt ccattgatgc cttcaaggac ttgtagtgg catctgaaac tagtgattgt 420
 gtggtttctt caacattaag tctgagaaa gattccgtg tcatgtcac aaaaccattt 480
 atgttaccct ctgttcagc ctccggactt gaggtgaag cagcagctaa agaagcagca 540
 gctaaagaag cagcagctaa agaagcagca gctaaagctc tcgaggctga agcagcagct 600
 35 aaagaagcag cagctaaaga agcagcagct aaagaagcag cagctaaagc tcttgaggga 660
 tccacacctt taggacctgc tagtccctg cccagagct tctgtctaa gtgcttagag 720
 caagtgagga agatccaggg cgatggcgca gcgtccagg agaagctgtg tgccacctac 780

aagctgtgcc accccgagga gctggtgctg ctgggacact ctctgggcat cccctgggct 840
 cccctgagct cctgcccag ccaggccctg cagctggcag gctgctgag ccaactccat 900
 agcggccttt tcctctacca ggggctcctg caggccctgg aagggatatc ccccgagttg 960
 ggtccacact tggacacact gcagctggac gtgcccgaact ttgccaccac catctggcag 1020
 5 cagatggaag aactgggaat ggcccctgcc ctgcagcca ccaggggtgc catgccggcc 1080
 ttgcctctg cttccagcg ccgggcagga ggggtcctgg ttgctagcca tctgcagagc 1140
 ttctggagg tgcgtaccg cgttctacgc cacctgcgc agccgtaata agctt 1195

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Sulietas baltymas, kuris yra granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GCSF) heteromultimeras su kitu augimo faktoriumi, kurio bendroji formulė (I)



5

(I)

kur L yra linkerinė seka, X yra augimo faktorius, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš SCF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-3, IL-6 ir IL-11, a yra lygus 0-4; b yra lygus 0-4, kur monomerinių grandžių aminorūgščių sekos yra bent 95% identiškos atitinkamų natyvių baltymų aminorūgščių sekoms.

10 2. Sulietas baltymas pagal 1 punktą, kurio bendroji formulė (I), kur X yra SCF, a yra lygus 0 ir b yra lygus 0, ir linkerinė seka L yra pasirinkta iš aminorūgščių sekų grupės, susidedančios iš $(S-G_4)_n$, kur $n=2-8$ ir $SGLEA-(EAAAK)_m - ALEA-(EAAAK)_m - ALEGS$, kur $m=2-8$.

15 3. Sulietas baltymas pagal 2 punktą, kur linkerinė seka L yra pasirinkta iš aminorūgščių sekų grupės, apimančios SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4 ir SEQ ID Nr. 5.

4. Sulietas baltymas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, kurio aminorūgščių seka yra pasirinkta iš grupės, apimančios SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9 ir SEQ ID Nr. 10.

20 5. Sulietas baltymas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, pasižymintis prailgintu cirkuliacijos laiku *in vivo* ir sinergetiniu veikimu.

6. Rekombinantinės DNR fragmentas, koduojantis sulietą baltymą pagal 1-5 punktus.

25 7. Rekombinantinės DNR fragmentas pagal 6 punktą, kur koduojanti seka yra pasirinkta iš grupės, apimančios SEQ ID Nr. 11, SEQ ID Nr. 12, SEQ ID Nr. 13, SEQ ID Nr. 14 ir SEQ ID Nr. 15.

8. Granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ir kamieninių ląstelių faktoriaus heterodimerinio baltymo, apibrėžto 2-5 punktuose, gavimo būdas, apimantis tokias stadijas:

30 a) konstruoja DNR fragmentą, koduojantį tikslinį baltymą ir paruošia bakterinį producentą;

- b) producentą, kurio ląstelės turi DNR seką, koduojančią tikslinį baltymą, kultivuoja tinkamoje mitybinėje terpėje,
- c) vykdo producento mikroorganizmų lyzę ir atskiria netirpią baltymo frakciją,
- d) tirpina netirpią baltymo frakciją,
- 5 e) vykdo tikslinio baltymo renatūraciją,
- f) vykdo tikslinio baltymo gryninimą;
- b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tikslinis baltymas yra genetiškai sulietas baltymas pagal 2-5 punktus;
- stadijoje b) producentą kultivuoja sąlygomis, kurios tinkamos minėto genetiškai sulieto baltymo heterodimerinės konstrukcijos ekspresijai;
- 10 - stadijoje d) netirpią baltymo frakciją tirpina buferiniame tirpale esant chaotropiniam agentui karbamidui ir redukuojančiam agentui ditioneitolui;
- stadijos e) heterodimerinio baltymo renatūracija yra oksidacinė renatūracija tarpinės karbamido koncentracijos buferiniame tirpale esant redukuojančiam agentui ditioneitolui (DTT) ir oksiduojančiam agentui oksiduotam glutationui (GSSG);
- 15 - stadijoje f) renatūruotą tikslinį baltymą grynina, nuosekliai atliekant anijonų mainų chromatografiją, su tolimesne mišraus veikimo chromatografija ir katijonų mainų chromatografija.
9. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą heterodimerinio baltymo renatūraciją vykdo buferiniame tirpale, kurio pH 7,5 – 8,5 esant 2M karbamido koncentracijai, dalyvaujant ditioneitolui ir oksiduotam glutationui, kurių molinis santykis yra 5-1:1-5; pirmenybę teikiant buferiniam tirpalui, kurio pH 8,0, ir DTT:GSSG moliniam santykiui 1:5.
- 20
10. Būdas pagal 8 arba 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadijos f) anijonų mainų chromatografiją vykdo su DEAE-Sepharose FF sorbentu prie pH 7,0-8,5, pirmenybę teikiant pH reikšmei 7,5, taikant laiptinę eliaciją; mišraus veikimo chromatografiją vykdo su CHT hidroksiapatito sorbentu prie pH 6,5-7,5, pirmenybę teikiant pH reikšmei 7,2; katijonų mainų chromatografiją vykdo su SP-Sepharose FF sorbentu prie pH 4,5-5,2, pirmenybę teikiant pH reikšmei 4,7; gautą tikslinio baltymo tirpalą koncentruoja ir saugo natrio acetatiniame buferiniame tirpale.
- 25
- 30
11. Būdas pagal bet kurį iš 8-10 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadijoje a) minėtą DNR fragmentą, koduojantį tikslinį genetiškai sulietą baltymą pagal 2-5 punktus, įjungia į ekspresijos plazmidę pET21b ir atrinktas plazmides transformuoja į bakterijų *E. coli* BL21(DE3) kamieną, ir stadijoje b) minėtą producentą kultivuoja LB terpėje 37°C

temperatūroje iki optinio tankio (OD_{600nm}) 0,8-1,2, induktoriumi naudojant izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidą.

12. Sulfatas SCF-GCSF baltymas, gautas būdu pagal 8-11 punktus.

13. Sulfatas SCF-GCSF baltymas pagal 12 punktą, skirtas naudoti terapijoje.

- 5 14. Farmacinė kompozicija, apimanti veiklųjį komponentą ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį, skiediklį, ekscipientą ir/arba pagalbines medžiagas, besiskirianti tuo, kad veiklusis komponentas apima sulfato baltymo pagal bet kurį iš 1-5 arba 12-13 punktų terapiškai veiksmingą kiekį.

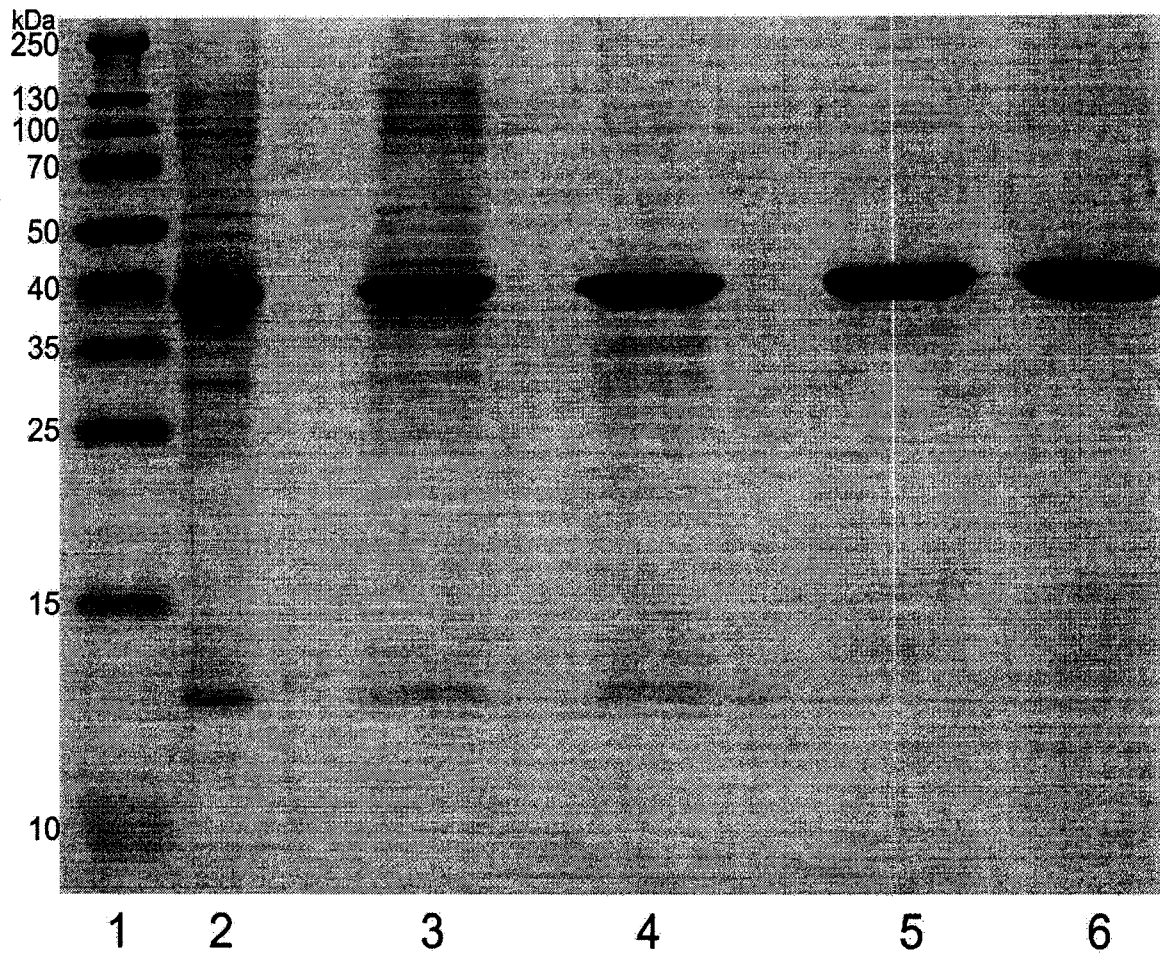


Fig. 1

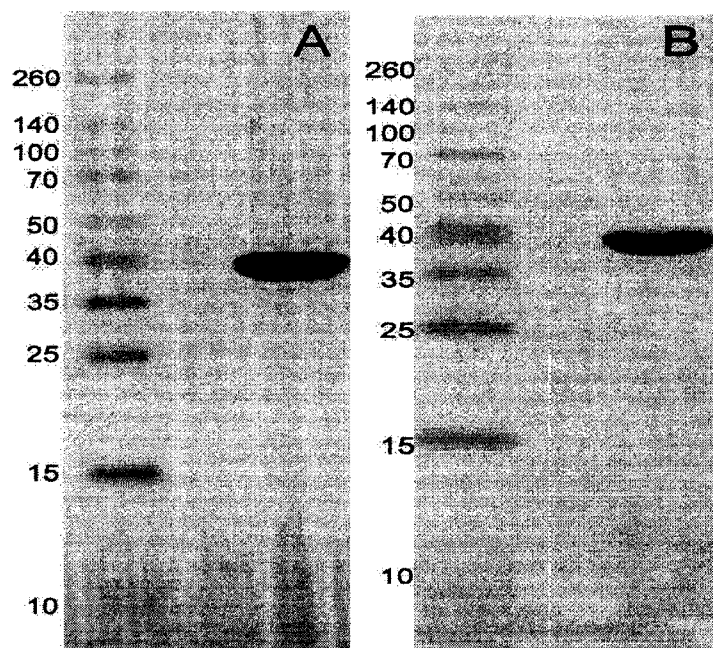


Fig. 2

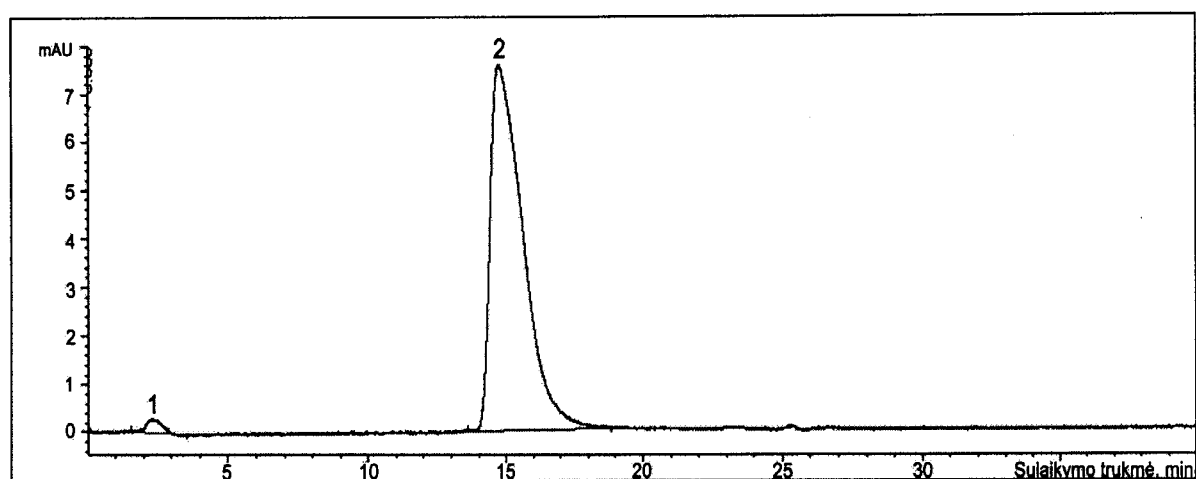


Fig. 3

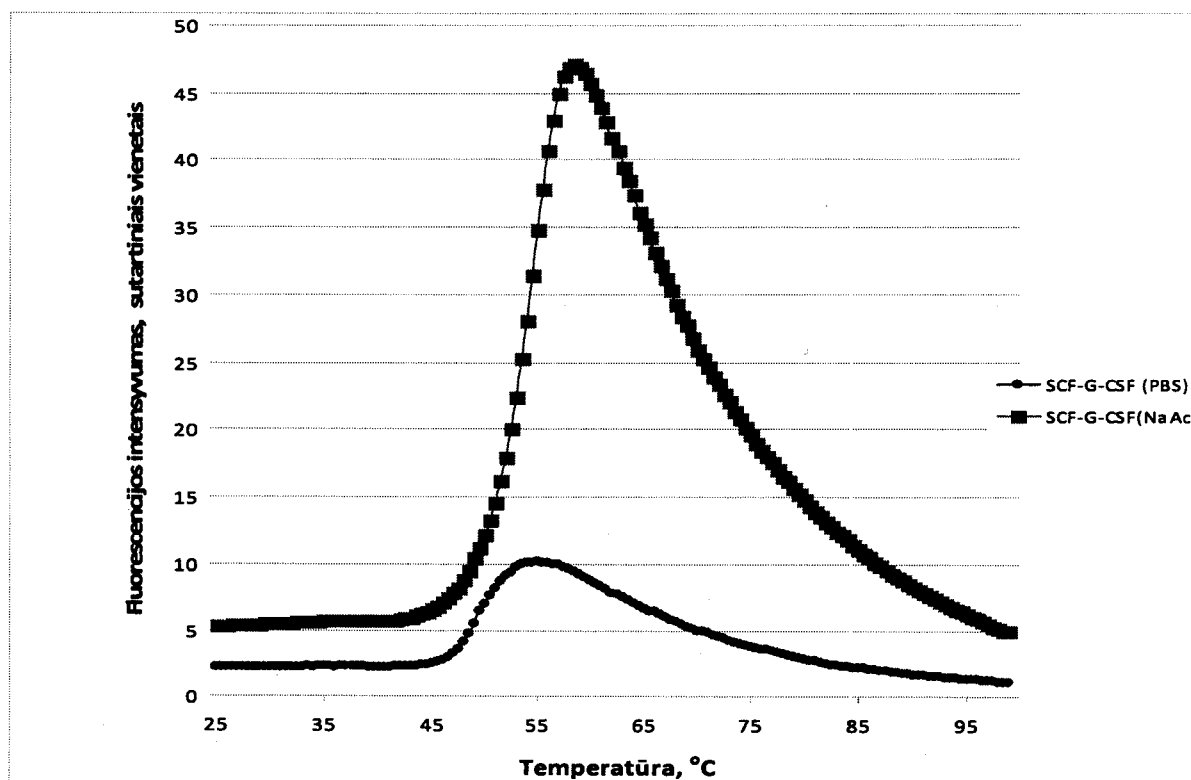


Fig. 4

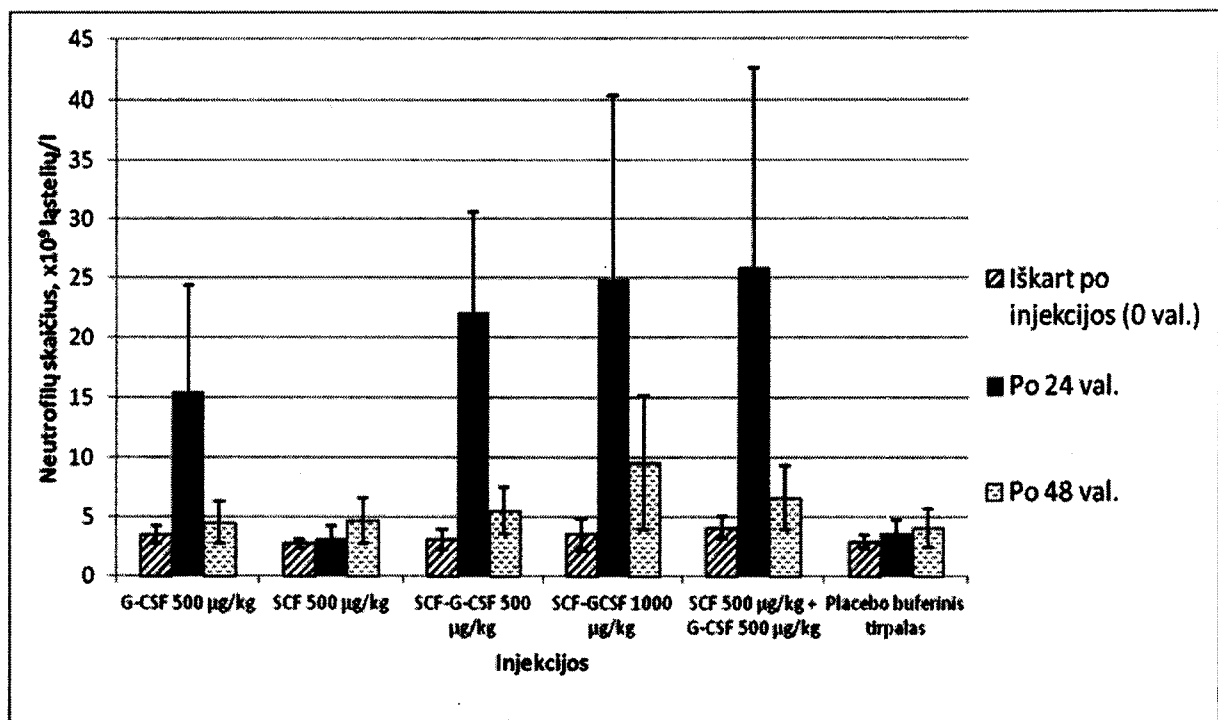


Fig. 5

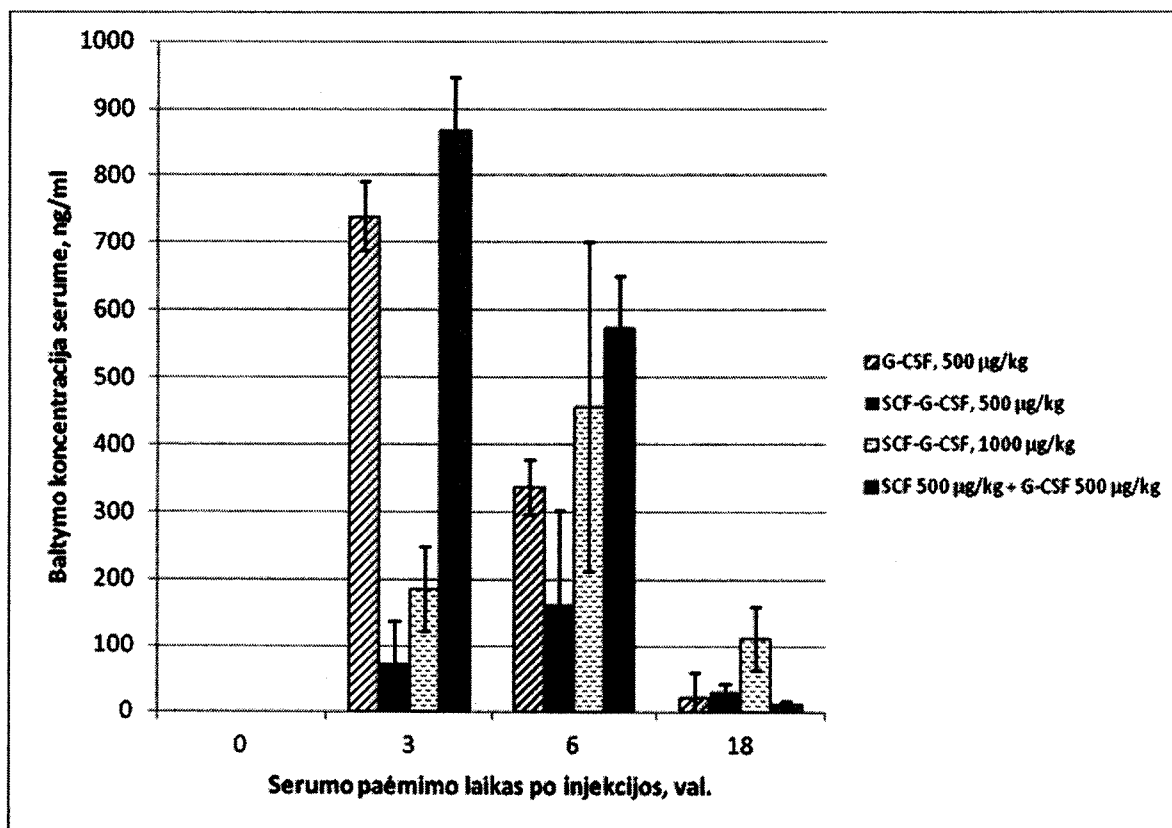


Fig. 6