

(19)



(10) **LT 6164 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **6164**

(51) Int. Cl. (2015.01): **C07K 19/00**

(21) Paraiškos numeris: **2013 118**

C07K 14/00

A61K 38/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2013 10 15**

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

(45) Patento paskelbimo data: **2015 06 25**

(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: —

(72) Išradėjas:

Vladas Algirdas BUMELIS, LT
Saulė SŪDŽIUVIENĖ, LT

(73) Patento savininkas:

**UAB Biotechnologinės farmacijos centras „Biotechpharma“, Mokslininkų g. 4,
LT-08412 Vilnius, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

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

(54) Pavadinimas:

Sulieti interferono-alfa 5 baltymai su kitu citokinu ir jų gamybos būdas

(57) Referatas:

Šis išradimas aprašo viso ilgio sulietus interferono-alfa 5 baltymus su kitu citokinu, kurie atitinka formulę X-IFNa5 ar IFNa5-X. Du segmentai yra sujungti be polipeptido linkerio. Taip pat aprašytos yra nukleorūgščių sekos, koduojančios tokius interferono sulietus baltymus, raiškos vektoriai, turintys šias sekas ir interferono sulietų baltymų terapinis panaudojimas. Taip pat aprašytos minėtų sulietų baltymų biosintezės ir gryninimo schemos. IFNa5 sulieti baltymai yra skirti įvairių virusinių ir vėžinių ligų gydymui, bei autoimuninių ligų, tokių kaip reumatoidinis artritas, gydymui.

Išradimo sritis

Šis išradimas susijęs su imunomoduliuojančiu chimeriniu baltymu, kuris yra naudingas kaip antivirusinė ir priešnavikinė priemonė. Labiausiai šis išradimas susijęs su genu, koduojančiu žmogaus interferoną alfa, sulietą su tokiu pačiu arba kitokiu interferonu alfa (pageidautina žmogaus interferonu alfa-2b) arba kitokiu citokinu (pageidautina žmogaus natyviu subrendusiu onkostatino M baltymu). Sulieto chimerinio konstrukto N-galo arba C-galo fragmentu gali būti IFNa5. Taip pat šis išradimas susijęs su minėto chimerinio geno įterpimu į tinkamą šeimininką, rekombinantinio kamieno kultūros gavimu ir heterologinio polipeptido raiškos stimuliavimu bei jo kaupimusi netirpiuose tarpiniuose kūneliuose. Išradimas taip pat numato fermentinį anksčiau minėto sulieto baltymo gamybos būdą kartu apimantį ir tinkamą baltymo gryninimo būdą. Šis išradimas ypač susijęs su sulieto baltymo gavimu naudojant atitinkamą geną, įterptą į rekombinantinį *Escherichia coli* kamieną, taip užtikrinant N-metionilintą subrendusio baltymo formą. Be to, išradimas taip apima minėto baltymo išskyrimo iš netirpios bakterinio kamieno frakcijos ir gryninimo būdu tirpinant (soliubilizuojant), oksiduojant ir atliekant medžiagos chromatografiją.

Suformuluojamas stabilus išskirto baltymo preparatas.

Išradimo technikos lygis

Interferonai yra gerai žinomi farmacijos rinkoje baltymai, kurie yra svarbūs daugumos vėžinių ir hepatito susirgimų gydymo komponentai. Šie citokinai pasižymi antivirusiniu, priešnavikiniu ir imunomoduliuojančiu aktyvumu, ir jų raiška plačiai pasireiškia vykstant įvairiems imunogeniniams procesams. IFNa2b ir IFNa5 yra alfa interferonai, kurie skirtingu giminingumu jungiasi prie to paties IFNAR1/2 receptoriaus komplekso ir kurie gali vienas kitą papildyti, pvz., gydant nuo hepatito C. OSM naudojimas gydant piktybinius navikus paprastai būna susijęs su gydymo periodu pasireiškiančiomis neutropeninėmis infekcijomis, gydant pvz., krūties vėžį, limfomą ar leukemiją.

Interferonai, pasižymėdami antivirusiniu, priešnavikiniu ir imunomoduliuojančiu aktyvumu, kartu veikia ląstelių augimą ir diferenciaciją su kryžminiu aktyvumu hormonų (epinefrino, adrenokortikotropino) funkcijų atžvilgiu (Dummer, R.; Mongana, J. 2009. Long term pegylated inteferon- α and its potential in

the treatment of melanoma. *Biologics: targets & therapy* 3: 169–182). Šiuo metu interferonai sudaro svarbią biofarmacinių preparatų grupę gydant įvairias autoimunines ir vėžines ligas, taip pat laikytini preparatais, stimuliuojančiais imuninį atsaką į virusinius patogenus. Rekombinantiniai interferonų preparatai yra registruoti rinkoje kaip naudotini gydant keletą vėžio rūšių (alfa interferonai ir natūralūs plazmos interferonų mišiniai), hepatitą B ir C (alfa interferonai), išsėtinę sklerozę (beta interferonas), reumatoidinį artritą (gama interferonai) bei kaip profilaktinių vakcinų adjuvantai ar koadjuvantai (Crommelin, D. J. A.; Sindelar, R. D. 1997. *Pharmaceutical biotechnology*. Harwood academic publishers. 369 p. ISBN 90-5702-249-4; Wang, H., et al. 2010. Recombinant human interferon-like proteins. JAV patentas Nr: 20100099612. Wang, W., et al. 2008. Effects of high-dose IFN α 2b on regional lymph node metastases of human melanoma: modulation of STAT5, FOXP3, and IL-7. *Clinical cancer research* 14: 8314 – 8320). Interferonas alfa taip pat naudojamas gydant plaukuotųjų ląstelių leukemiją, su AIDS susijusią Kapoši sarkomą, lėtinę mielogeninę leukemiją ir inkstų ląstelių karcinomą.

Dėl jų antivirusinio ir priešnavikinio aktyvumo kartu su įtaka įgimtojo nespecifinio imuniteto reakcijoms, dauguma gydymo metodų medicinoje naudoja alfa interferonus rekombinantinių baltymų arba natūralių mišinių, kuriuos išskiria užkrėstos žmogaus limfocitų ląstelių kultūros, formoje.

Yra žinoma daugybė patentų, kur aprašomi įvairūs rekombinantinio interferono preparatai įvairių šeimininkų organizmuose (WO2004039996, WO 2007022799, WO 2011109556 ir kt.).

Tačiau šie baltymo preparatai paprastai organizme išlieka trumpai, todėl gydant naudojamos didelių koncentracijų dozės, dėl ko toliau pasireiškia stiprūs neigiami šalutiniai poveikiai (Crommelin, D. J. A.; Sindelar, R. D. 1997. *Pharmaceutical biotechnology*. Harwood academic publishers. 369 p. ISBN 90-5702-249-4). Siekiant sumažinti šiuos poveikius, konstruojami chimeriniai interferonų analogai, kurių toksiškumas mažesnis, o pusamžis plazmoje ilgesnis, tokiu būdu dozės koncentracija gali būti mažinama (WO2007002233 ir kt.).

Siekiant pagerinti farmakokinetines interferonų savybes ir sumažinti dozių dažnį, buvo sukurta keletas stabilizavimo strategijų, tokių kaip asociacija su cheminėmis liekanomis, pavyzdžiui, 2-sulfo-9-fluorenilmetoksikarbonilu, rekombinantinis ilgo poveikio žmogaus albumino sulietas baltymas, ir kitokie metodai,

pvz., baltymo prijungimas prie stambesnių struktūrų, tokių kaip polietileno glikolis.

Interferonas alfa-2b yra vienas labiausiai ištirtų anksčiau minėtos šeimos potipių, skirtas gydyti įvairias vėžio rūšis bei hepatitą B ir C (Crommelin, D. J. A.; Sindelar, R. D. 1997. Pharmaceutical biotechnology. Harwood academic publishers. 369 p. ISBN 90-5702-249-4). Yra parodyta (WO9958143), kad interferono alfa 5 baltymas turi didelį hepatito C gydymo potencialą, nes tokios infekcijos metu šio baltymo kiekis sumažėja.

Yra žinomi ir sukonstruoti įvairūs šių baltymų rekombinantiniai analogai – sulieti baltymai su žmogaus serumo albuminu, įvairiais alfa interferono fragmentais arba Ig Fc receptoriaus segmentais (WO0069913, kt.), polipeptidų ir polinukleotidų fragmentų deriniai, skirti gydymui ir diagnostikai (WO03000896, kt.). Daug tirta kombinuota terapija derinant IFNa2b su IFNa5, tačiau vis dar lieka neaišku, ar gydant abiem baltymais pasiekiamas didesnis efektyvumas.

Dauguma interferonų, tarp jų ir anksčiau minėti IFNa2b ir IFNa5, ekspresuojami rekombinantinėse bakterinėse sistemose dėl jų aukšto produktyvumo ir baltymų neglikozilinimo (Loignon, M., et al. 2008. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. BMC Biotechnology 8: 65).

Tiek IFNa2b, tiek IFNa5 jungiasi prie to paties IFNAR1/2 receptoriaus komplekso, tačiau sukelia kiek skirtingas reakcijų grandines (Jaks E., Gavutis M., Uzé G., Martal J., Piehler J.: Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. J Mol Biol 2007, 366(2): 525–539). Nors buvo parodyta, kad citokino kovakcinavimas siekiant sukurti efektyvias virusines vakcinas, turi didelį potencialą ir ypač pagerina imunitetą, kurį sukelia virusinės DNR vakcinos nuo ŽIV, visgi transgeninių pelių kombinuotas gydymas derinant IFNa5 ir IFNa6 nedavė pakankamai reikšmingų klinikinių tyrimų rezultatų.

Sulietojo baltymo formos kompleksas, kuriame I tipo IFN yra prijungtas prie žmogaus interferono α/β receptoriaus kovalentine jungtimi arba peptidiniu linkeriu, yra atkleistas patente EP1037658 (1997-12-19 prioritetas).

Toks suliejimas imituoja tam tikrą medžiagų apykaitos būklę, kai I tipo interferonai organizme cirkuliuoja susijungę su savo tirpiaisiais receptoriais. Kai

pasiekama tam tikra IFN ir jo receptoriaus koncentracija, tai gali sumažinti ir sulėtinti imuninį atsaką dėl tirpių receptorių kraujo plazmoje konkurencinio jungimosi. Dėl šios priežasties toks sulietas baltymas gali tiek skatinti, tiek slopinti priešuždegiminį atsaką, priklausomai nuo paciento ir ligos eigos.

Patente EP2412730 (2009-03-27 prioritetas) atskleistas sulietas baltymas, apimantis interferono alfa baltymą, sulietą su citoplazminiu transdukcijos peptidu, ir papildomai prijungtą polietileno glikolį. Tai leidžia kurti vaistus baltymo pagrindu, kurių mažos dozės veiksmingos įvairių kepenų ligų, susijusių su virusinėmis infekcijomis, profilaktikai arba gydymui.

Vaistinių medžiagų gamyboje atsiradus pegilinimo technologijoms, tai tapo viena iš svarbiausių strategijų siekiant prailginti farmakokinetinį aktyvumą. Tačiau pegilinimas stipriai slopina absorbciją ląstelių lygyje ir endosominį išlaisvinimą, kas pasireiškia ženkliai pristatymo sistemos aktyvumo praradimu. Stambios PEG grupės didina hidrodinaminį molekulės tūrį, taip kad tampa mažai tikėtinas išskyrimas per inkstus dėl inkstų pamatinės membranos mažo pralaidumo. Šios dvi pegilinto baltymo savybės gali būti lemtingos ilgiems klinikiniams tyrimams, net jei jie pasižymi prailgintu veikimu ir mažų dozių veiksmingumu.

Sulietas baltymas, pasižymintis interferono alfa biologiniu aktyvumu ir galintis koncentruoti interferoną alfa kepenyse, yra žinomas iš patento EP1187852 (prioritetas 1999.05.19). Toks sulietas baltymas kryptimi nuo N galo į C galą apima imunoglobulino Fc sritį, gautą iš IgG1 arba IgG3, ir tikslinį baltymą, kurį sudaro interferonas alfa. Fc sritis ir tikslinis baltymas yra sujungti betarpiškai arba polipeptidiniu jungtuku (linkeriu). Šis sulietas baltymas naudojamas gydant kepenų ligas, ypač hepatitą.

Šiame patente minėtas sulietas baltymas turi du pagrindinius trūkumus. Toks sulietas baltymas yra skirtas kepenims ir yra naudotinas tik gydant hepatitą B arba C. Minėtų imunoglobulino Fc sričių prijungimas, gydant ilgesnį laiką, gali sukelti neutralizuojančių antikūnų susidarymą, dėl kurių sumažėja terapinis efektas ir paciento atsparumas ilgalaikiam gydymui.

Sulietas baltymas pagal mūsų siūlomą išradimą yra universalesnis: suliejus IFN alfa 5 su interferonu alfa 2b, jis gali būti aktyvus pasikartojančios melanomos gydyme. Sulieti alfa 2b baltymai (tiek IFNa5-IFNa2b, tiek IFNa2b-IFNa5) gali būti

skiriami imunitetui moduluoti, įvairioms vėžio formoms (melanomoms, limfomoms ir sarkomoms) gydyti, o taip pat prieš virusus, pvz., Artimųjų Rytų respiratorinio sindromo koronavirusą, arba tokių odos sutrikimų atvejais, kaip ŽPV infekcijų sukeliama odos ar gleivinės pažeidimai. Suliejus su citokinu OSM, toks baltymas gali būti skiriamas lėtinio hepatito C gydymui, kai gydymas vien IFNa5 neveiksmingas. Bendrai paėmus, siūlomo išradimo sulieti baltymai nėra skirti vienam konkrečiam žmogaus organui, bet demonstruoja kombinuotos terapijos požymius, ir gali būti skiriami, gydant platų virusinių ir vėžinių ligų spektrą.

Iš to, kas išdėstyta, aišku, kad poreikis sulėtinti pasišalinimo iš plazmos greitį, kas leistų naudoti mažesnes dozes ir susilpnintų šalutinius poveikius, yra reali ir aktuali šios srities problema.

Todėl kuriant sulietą baltymą, pagamintą iš dviejų viso ilgio interferonų, būtų įdomu išbandyti tokio chimerinio baltymo antivirusinį aktyvumą ir pasišalinimo greitį.

Kita rimta techninė problema yra susijusi su sunkumais išskiriant ir ypač gryninant tokius naujus sulietus baltymus. Siekiant įveikti šią problemą, reikia išrasti subalansuotą viso proceso, skirtą efektyviai gauti tikslinį produktą, sistemą, kiek įmanoma išsaugant suliejimo partnerių aktyvumo tipą.

Apibrėžimai

Aiškumo dėlei čia pateikiamos kai kurių šio išradimo kontekste naudojamų terminų ir išsireiškimų reikšmės.

Terminu „interferonas alfa 5“ (arba IFNa5) čia ir toliau vadinamas baltymas, gaminamas leukocituose, kuris aktyviausiai daugiausiai yra susijęs su įgimtuju imuniniu atsaku į virusines infekcijas ir kuris gali prisijungti prie specifinio ląstelės paviršiaus receptoriaus komplekso, žinomo kaip IFNa receptorių (IFNAR). IFNa5 apima baltymus, kurių (I) aminorūgščių seka yra bent iš esmės identiška natyvaus IFNa5 baltymo aminorūgščių sekai, ir kurie (II) pasižymi natyviu IFNa5 būdingu biologiniu aktyvumu.

Terminu „interferonas alfa 2b“ (IFNa2b) vadinamas normalių žmogaus leukocitų gausiausiai gaminamas interferonas alfa 2b. Leukocitų gaminamas IFNa2b

priklauso interferonų šeimai ir yra daugiausiai susijęs su įgimtoju imuniniu atsaku į plačią virusinių infekcijų grupę, pvz., hepatito B ir C. Rekombinantinį IFN α 2b skiria pacientams, sergantiems pasikartojančiomis melanomomis, bei kaip imunomoduliuojančią priemonę, siekiant sustiprinti įgimtos imuninės sistemos atsaką į virusinius patogenus veikiant išorinius ląstelės receptorius ir stimuliuojant šeimnininko viduląstelinį ir ekstraląstelinį aktyvumą.

Terminu „onkostatinas M“ (OSM) vadinamas baltymas, kurį gamina aktyvintieji T limfocitai, monocitai, mikroglijos. Pagal savo struktūrą ir funkcijas jis priskiriamas hematopoetinių ir neutrofinių citokinių, žinomų kaip interleukinai 6 (IL6) tipo citokinių šeimai, pošeimiui. Žmogaus OSM signalo perdavimas sąlygotas jo prisijungimu prie dviejų receptorių kompleksų: I tipo OSM receptoriaus komplekso (LIF receptoriaus), susidedančio iš interleukino 6 signalo keitiklio (gp130) ir leukemijos slopinimo faktoriaus receptoriaus (LIFR) subvienetų bei II tipo OSM komplekso (OSM receptoriaus), susidedančio iš gp130 ir OSM receptoriaus beta (OSMR) subvienetų.

Toliau vartojamu terminu „chimerinis IFN α 5 baltymas“ vadinamas baltymas, kurį produkuoja mikroorganizmai, transformuoti panaudojant sulietą geną, koduojantį baltymą, kur N-galinės arba C-galinės dalies aminorūgščių seka yra bent iš esmės identiška natyvaus žmogaus IFN α 5 aminorūgščių sekai.

„Iš esmės identiška aminorūgščių seka“ reiškia, kad sekos yra identiškios arba skiriasi vienos ar daugiau (iki 5 %) konservatyvių aminorūgščių mutacijomis arba pakeitimais (t. y. delecijomis, tarpais ar pakaitais), kurie nesukelia neigiamų funkcinių skirtumų tarp rekombinantinio baltymo ir natyvaus žmogaus IFN α 5, IFN α 2b arba OSM. Sekos procentinį identiškumą galima nustatyti naudojant programą BLAST („blast2seq“, numatytieji parametrai) [Tatutsova and Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247–250 (1990)].

Čia vartojamu terminu „mikroorganizmas, produkuojantis IFN α 5 sulietą baltymą“ vadinamas mikroorganizmas, kuris buvo genetiškai modifikuotas taip, kad gamintų baltymą, pasižymintį su žmogaus IFN α 5 siejamu biologiniu aktyvumu. Atitinkamai, terminu „E. coli ląstelė šeimininkė, produkuojanti IFN α 5 sulietą baltymą“ vadinama E. coli ląstelė šeimininkė, kuri buvo genetiškai modifikuota taip, kad gamintų baltymą, pasižymintį su IFN α 5 siejamu biologiniu aktyvumu.

Terminai „plazmidė“, „vektoriaus sistema“ arba „raiškos vektorius“ reiškia

konstrukta, galintį vykdyti ekspresiją *in vivo* arba *in vitro*. Šio išradimo kontekste tokie konstruktai gali būti naudojami, į ląsteles šeimininkes įterpiant genus, koduojančius tikslius sulietus baltymus.

Optimaliai raiškos vektorius yra įjungiamas į tinkamo šeimininko organizmo genomą. Terminas „įjungtas“ optimaliai apima stabilų jungimąsi į genomą.

Terminas „reguliacinės sekos“ apima promotorius, stipriklis ir kitus raiškos reguliacijos signalus. Reguliacinė seka, „funkciškai susieta“ su koduojančiąja seka, yra prijungta tokiu būdu, kad koduojančios sekos raiška pasiekama sąlygomis, kurios suderinamos su kontroliuojančiomis sekomis.

Terminas „promotorius“ vartojamas šioje srityje įprasta prasme, pvz., RNR polimerazės jungimosi vieta.

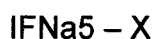
Terminas „ląstelė šeimininkė“ šio išradimo kontekste apima bet kurią ląstelę, turinčią arba nukleotidų seką, arba raiškos vektorių, aprašytus aukščiau, ir kuri yra naudojama rekombinantiniu būdu gauti tikslinį sulietą baltymą, pasižymintį specifinėmis savybėmis, kurios nurodytos čia arba šio išradimo būdo aprašyme.

Kaip „išskirtas“ ir/arba „išgrynintas“ suprantamas IFNa5 sulietas baltymas, kai jis yra santykinai grynas, t. y. mažiausiai apie 90 % grynumo, pageidautina bent apie 95 % grynumo, geriausia bent 98 % grynumo.

IŠRADIMO ATSKLEIDIMAS

Išradimo esmė

Pagrindinis šio išradimo tikslas yra sulietas baltymas, apimantis interferoną alfa 5 (IFNa5), kurio bendroji formulė yra (I) arba (II),



(I)



(II)

kur suliejimo partneris X yra kitas interferonas alfa arba citokinas.

Konkrečiau siūlomas išradimas apima sulietus baltymus, kuriuose IFNa5 yra rekombinantinis žmogaus interferonas alfa 5 ir X yra pasirenkamas iš grupės, susidedančios iš IFNa5, IFNa2b ir onkostatino.

Šio išradimo objektai apima tokius baltymus, kaip:

IFNa5-IFNa5 homodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 1 arba kurio seka yra jai identiška mažiausiai 95 %;

IFNa2b-IFNa5 heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 2 arba kurio seka yra jai identiška mažiausiai 95 %;

IFNa5-IFNa2b heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 3 arba kurio seka yra jai identiška mažiausiai 95 %;

IFNa5-OSM heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 4 arba kurio seka yra jai identiška mažiausiai 95 %;

OSM-IFNa5 heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 5 arba kurio seka yra jai identiška mažiausiai 95 %.

Optimaliame įgyvendinimo variante šio išradimo sulietas baltymas pasižymi IFNa5 būdingu biologiniu aktyvumu ir kartu prailgintu pasišalinimo iš organizmo laiku, bent jau žiurkių serumo mėginiuose.

DNR fragmentas, koduojantis minėtą sulietą baltymą, turi koduojančiąją seką, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, arba sekos, koduojančios tą patį baltymą. Tinkamas vektorius, apimantis DNR fragmentą, koduojantį sulietą šio išradimo baltymą, yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš pET21b+, pET28a+, pUC57/T arba pT7, optimaliai yra pET21b+.

Kitas šio išradimo aspektas yra sulieto baltymo pagal siūlomą išradimą gamybos būdas vykdant raišką atitinkamoje ląstelėje šeimininkėje, kur būdas apima stadijas, kuriose:

a) paruošia ląsteles šeimininkes, produkuojančias minėtą IFNa5 sulietą baltymą;

b) kultivuoja ląsteles šeimininkes sąlygomis, efektyviomis ekspresuoti minėtą IFNa5 sulietą baltymą tinkamoje fermentacijos terpėje;

c) išskiria ir grynina ekspresuotą IFNa5 sulietą baltymą.

Šio išradimo būdas skiriasi tuo, kad:

- minėtas išskyrimas yra išskyrimas iš b) stadijoje gauto mišinio, apimančio tikslinį

sulietą baltymą intarpinių kūnelių pavidalu, vykdant jų tirpinimą ir po to – oksidacinę renatūraciją; ir

- minėtas gryninimas yra trijų pakopų chromatografinis apdorojimas, kuriame:

minėtą mišinį, apimantį renatūruotą IFNa5 sulietą baltymą, apdoroja hidrofobinės sąveikos chromatografiją;

po to gautą prieš tai einančioje pakopoje mišinį veikia anijonų mainų chromatografija;

ir toliau gautą ankstesnėje pakopoje tirpalą grynina katijonų mainų chromatografija.

Sąlygos, efektyvios ekspresuoti minėtą IFNa5 sulietą baltymą, apima indukciją, optimaliai su izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidu (IPTG), optimaliai IPTG esant 0,1mM – 1 mM koncentracijos, geriausia 0,5 mM koncentracijos, ir indukcija nebūtinai yra perkelta į ankstyvą auginimo stadiją.

Viename iš išradimo įgyvendinimo variantų ląstelė šeimininkė yra pasirenkama iš *E. coli*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, optimaliai *E. coli*, geriau - proteazių neturinčio *E. coli* kamieno, tokio kaip *E. coli* BL21 ir *Rosetta gami-2*, geriausia - *E. coli* BL21, ir kur fermentacijai tinkama terpė yra bet kuri sudėtinė terpė, apimanti mielių ekstraktą kaip azoto šaltinį ir gliukozę kaip anglies šaltinį, optimaliai M9m terpė.

Kitame išradimo įgyvendinimo variante tirpinimo stadiją atlieka chaotropiniame ir denatūruojančiame tirpale, kuris apima 6–8 M karbamidą arba 4–6 M guanidino hidrochloridą, optimaliai 6 M guanidino hidrochloridą, nebūtinai turintį 20 mM ditionitritolio DTT.

Oksidacinę renatūraciją pagal optimalų siūlomo išradimo įgyvendinimo variantą vykdo glicino/NaOH burefyje pH intervale 7,0–9,6 ir esant redukuotojo/oksiduotojo glutationo poros GSH/GSSH santykiui 5–20:1 su buferinę talpą turinčiais priedais, pasirinktais iš grupės, susidedančios iš natrio chlorido, natrio sulfato ir amonio sulfato.

Šio išradimo trijų pakopų chromatografiniame gryninime hidrofobinės sąveikos chromatografijos sorbentas yra pasirenkamas iš grupės, susidedančios iš butil-Sefarozės, oktil-Sefarozės, fenil-Sefarozės, optimaliai yra fenil-Sefarozė, pH esant

intervale 8,2–9,2; anijonų mainų chromatografijos sorbentas yra pasirenkamas iš grupės, susidedančios iš ANX-Sefarozės, Q-Sefarozės, DEAE-Sefarozės, QAE-Sefarozės, optimaliai Q-Sefarozės arba DEAE-Sefarozės, pH esant intervale 8,6–9,0; ir katijonų mainų chromatografijos sorbentas yra pasirenkamas iš grupės, susidedančios iš S-Sefarozės, SP-Sefarozės ir CM-Sefarozės, optimaliai SP-Sefarozės arba CM-Sefarozės, pH esant intervale 5,2–5,6.

Kiti šio išradimo aspektai yra išradimo būdu gauti sulietas baltymas ir preparatas, apimantis sulietą baltymą pagal siūlomą išradimą stabilaus tirpalo formoje. Tiek šio išradimo sulietas baltymas, tiek preparatas yra skirti naudoti terapijoje.

Farmacinė kompozicija pagal šį išradimą apima minėto sulieto baltymo arba minėto preparato terapiškai veiksmingą kiekį ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį, ekscipientą ir/arba pagalbines medžiagas.

Toliau išradimas aprašomas išsamiau, su nuorodomis į pateiktus brėžinius ir pavyzdžius.

Trumpas brėžinių aprašymas

Sulietų IFNa5 baltymų pagal siūlomą išradimą paruošimas iliustruojamas 1–8 brėžiniais.

Fig.1 yra IFNa5-IFNa5 homodimero klonavimo schema.

Fig. 2 parodyta IFNa2b-IFNa5 heterodimero klonavimo schema.

Fig. 3 pateiktas IFNa2b-IFNa5/pET21b+ genolapis su restrikcijos endonukleazėmis, kurios naudotos atliekant klonų restrikcijos schemos analizę.

Fig. 4 pateiktos augimo kreivės ir biosintezės parametrų charakteristikos skirtingose augimo terpėse, kaip pavyzdį naudojant IFNa2b-IFNa5/pET21b+/E.coli BL21 (DE3) kamieno sistemą.

Fig. 5 pateiktas IFNa2b-IFNa5, ekspresuoto E.coli BL21 (DE3) / pET21b+ sistemoje, SDS-PAGE ir Western-blot analizės vaizdas. 1 takelis – baltymo molekulinės masės markeris; 2 takelis – bendra baltymų frakcija (prieš indukciją); 3 takelis – bendra baltymų frakcija (2,5 val. po indukcijos); 4 takelis – tirpių baltymų

frakcija (2,5 val. po indukcijos); 5 takelis – netirpių baltymų frakcija (2,5 val. po indukcijos); 6 takelis – etaloninis IFNa5 tirpalas.

Fig. 6 pateikiama išgryninto IFNa2b-IFNa5 baltymo SE-HPLC.

Fig. 7 parodo suformuluotos IFNa2b-IFNa5 sulietos substancijos sidabru dažytos 15 % SDS-PAGE vaizdą. 2 takelis – SP-Sefarozė FF kolonėlės mėginys, 10 µg A6 fr.; 3 takelis – SP-Sefarozė FF kolonėlės mėginys, 1 µg A6 fr.; 4 takelis – mėginys iš SP-Sefarozė FF kolonėlės, 0,1 µg A6 fr. 1 ir 5 takeliai – baltymo molekulinės masės markeris („Fermentas“, #26616, serija #00079685).

Fig. 8 fig. yra IFNa5-IFNa2b baltymo HPLC vaizdas.

Detalus išradimo aprašymas

Išradimo objektai

Šio išradimo tikslas yra numatyti būdą gauti rekombinantinę DNR, koduojančią IFNa5 sulietą baltymą, kuris pasižymėtų fizikocheminėmis savybėmis, panašiomis į subrendusio natyvaus IFNa5. Kitas šio išradimo tikslas yra pagaminti bet kuriuos iš sulietų IFNa5 baltymų kontroliuojamos fermentacijos būdu. Dar vienas šio išradimo tikslas yra gauti IFNa5 sulietą baltymą grynoje formoje. Papildomas šio išradimo tikslas yra pagaminti farmacinę kompoziciją, apimančią minėtą IFNa5 sulietą baltymą.

Kaip paminėta anksčiau, pagrindiniai šio išradimo objektai yra sulieti IFNa5 baltymai, kurių bendroji formulė yra (I) arba (II), gaunami šio išradimo būdu, kur abu partneriai yra suliejami betarpiškai, be linkerio. Papildomos linkerio aminorūgščių sekos kartais ne visada pageidaujamos dėl jų nenusipėjamo toksiškumo, įtakos susivyniojimo bei proteolizės procesams ir dėl biopanašumo aspektų.

Konkrečiais išradimo įgyvendinimo atvejais tinkami yra 1 lentelėje žemiau išvardyti sulieti IFNa5 baltymai.

1 lentelė

Sekos ID Nr.	Sulietas baltymas	Molekulinė masė	Aminorūgščių seka
1	IFNa5-IFNa5	39161,7	MCDLPQTHSLSNRRTLMMMAQMGRISPFS CLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISV LHEMIQQTFLNFSTKDSSATWDETLLDKF YTELYQQLNDLEACMMQEVGVEDTPLMN

			VDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSLSANLQERLRRKECDLPQT HSLSNRRTLMIAMQMGRISPFSCDKDRHD FGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQT FNLFS TKDSSATWDETLLDKFYTELYQQ NDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVR KYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSANLQERLRRKE
2	IFNa2b- IFNa5	38906,5	MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFS CLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLH EMIQQIFNLFS TKDSSAAWDETLLDKFYTE LYQQNDLEACVIQGVGVGTETPLMKEDSIL AVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI MRSFSLSTNLQESLRSKECDLPQTHSLSN RRTLMIAMQMGRISPFSCDKDRHDFGFPQ EEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQT FNLFS TKDSSATWDETLLDKFYTELYQQNDLEA CMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVRKYFQRI TLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSA NLQERLRRKE
3	IFNa5- IFNa2b	38906,5	MCDLPQTHSLSNRRTLMIAMQMGRISPF CLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISV LHEMIQQT FNLFS TKDSSATWDETLLDKF YTELYQQNDLEACMMQEVGVEDTPLMN VDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSLSANLQERLRRKECDLPQT HSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHD FGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQND LEACVIQGVGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQ RITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL TNLQESLRSKE
4	IFNa5-OSM	41788,7	MCDLPQTHSLSNRRTLMIAMQMGRISPF CLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISV LHEMIQQT FNLFS TKDSSATWDETLLDKF YTELYQQNDLEACMMQEVGVEDTPLMN VDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEV VRAEIMRSFSLSANLQERLRRKEAAGSC SKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYI RIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRG LGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLP KAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLR NNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQP PTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMH SVGRVFSKWGESPNRSRR
5	OSM-IFNa5	41788,7	MAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDT SRLDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAF PSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRL ADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMA RPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKA

			GRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLH GYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRCD LPQTHSLSNRRTLMIAMQMGRISPFCLK DRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHE MIQQTFFNLFSTKDSSATWDETLLDKFYTE LYQQNLNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDS ILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRA EIMRSFSLSANLQERLRRKE
--	--	--	--

Mikroorganizmas, produkuojantis IFNa5 sulietą baltymą, gali būti sukuriamas įterpiant DNR fragmentą/nukleorūgšties molekulę, koduojančią chimerinį baltymą.

Konkretūs išradimo įgyvendinimo variantai apima šio išradimo sulietus IFNa5 baltymus koduojančias sekas, nurodytas žemiau 2 lentelėje

2 lentelė

Sekos ID Nr.	Sulietas baltymas	Koduojianti seka
6	IFNa5-IFNa5	ATGTGTG ATCTGCCGCA GACCCACTCC CTGTCTAACC GTCGTACTCT GATGATCATG GCACAGATGG GTCGTATCTC TCCTTTCTCC TGCCTGAAGG ACAGACATGA CTTTGGATTT CCTCAGGAGG AGTTTGATGG CAACCAGTTC CAGAAGGCTC AAGCCATCTC TGCCTCCAT GAGATGATCC AGCAGACCTT CAATCTCTTC AGCACAAAGG ACTCATCTGC TACTTGGGAT GAGACACTTC TAGACAAATT CTACACTGAA CTTTACCAGC AGCTGAATGA CCTGGAAGCC TGTATGATGC AGGAGGTTGG AGTGGAAGAC ACTCCTCTGA TGAATGTGGA CTCTATCCTG ACTGTGAGAA AATACTTTCA AAGAATCACT CTCTATCTGA CAGAGAAGAA ATACAGCCCT TGTGCATGGG AGGTTGTCAG AGCAGAAATC ATGAGATCCT TCTCTTTATC AGCAAACCTG CAAGAACGTT TACGTCGTAA GGAATGTG ATCTGCCGCA GACCCACTCC CTGTCTAACC GTCGTACTCT GATGATCATG GCACAGATGG GTCGTATCTC TCCTTTCTCC TGCCTGAAGG ACAGACATGA CTTTGGATTT CCTCAGGAGG AGTTTGATGG CAACCAGTTC CAGAAGGCTC AAGCCATCTC TGCCTCCAT GAGATGATCC AGCAGACCTT CAATCTCTTC AGCACAAAGG ACTCATCTGC TACTTGGGAT GAGACACTTC TAGACAAATT CTACACTGAA CTTTACCAGC AGCTGAATGA CCTGGAAGCC TGTATGATGC AGGAGGTTGG AGTGGAAGAC ACTCCTCTGA TGAATGTGGA CTCTATCCTG ACTGTGAGAA AATACTTTCA AAGAATCACT CTCTATCTGA CAGAGAAGAA ATACAGCCCT TGTGCATGGG AGGTTGTCAG

LT 6164 B

		AGCAGAAATC ATGAGATCCT TCTCTTTATC AGCAAACCTTG CAAGAACGTT TACGTCGTAA GGAATAA
8	IFNa5- IFNa2b	ATGTGTG ATCTGCCGCA GACCCACTCC CTGTCTAACC GTCGTA CTCT GATGATCATG GCACAGATGG GTCGTATCTC TCCTTTCTCC TGCCTGAAGG ACAGACATGA CTTTGGATTT CCTCAGGAGG AGTTTGATGG CAACCAGTTC CAGAAGGCTC AAGCCATCTC TGTCCCTCCAT GAGATGATCC AGCAGACCTT CAATCTCTTC AGCACAAAGG ACTCATCTGC TACTTGGGAT GAGACACTTC TAGACAAATT CTACACTGAA CTTTACCAGC AGCTGAATGA CCTGGAAGCC TGTATGATGC AGGAGGTTGG AGTGGAAGAC ACTCCTCTGA TGAATGTGGA CTCTATCCTG ACTGTGAGAA AATACTTTCA AAGAATCACT CTCTATCTGA CAGAGAAGAA ATACAGCCCT TGTGCATGGG AGGTTGTCAG AGCAGAAATC ATGAGATCCT TCTCTTTATC AGCAAACCTTG CAAGAACGTT TACGTCGTAA GGAA TGTG ATCTGCCGCA GACTCACTCT CTGGGTTCTC GTCGTA CTCT GATGCTGCTG GCTCAGATGC GTCGTATCTC TCTTTTCTCT TGCCTGAAAG ACCGTCATGA CTTTCGGTTTC CCGCAGGAAG AGTTCGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTGAAA CTATCCCTGT TCTGCATGAA ATGATCCAGC AAATCTTCAA CCTGTTCTCT ACTAAAGACT CTTCTGCTGC TTGGGACGAA ACCCTGCTGG ACAAATTCTA CACTGAACTG TACCAGCAAC TCAACGACCT CGAGGCTTGT GTTATTCAGG GCGTTGGTGT TACCGAACT CCGCTGATGA AAGAGGATAG CATCCTGGCT GTTCGCAAGT ATTTCCAGCG TATCACTCTT TACCTGAAGG AAAAGAAGTA TAGCCCGTGT GCTTGGGAAG TTGTTTCGTGC TGAGATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCTAC TAACCTGCAG GAATCTCTGC GTTCTAAGGA ATAG
7	IFNa2b- IFNa5	ATGTGTG ATCTGCCGCA GACTCACTCT CTGGGTTCTC GTCGTA CTCT GATGCTGCTG GCTCAGATGC GTCGTATCTC TCTTTTCTCT TGCCTGAAAG ACCGTCATGA CTTTCGGTTTC CCGCAGGAAG AGTTCGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTGAAA CTATCCCTGT TCTGCATGAA ATGATCCAGC AAATCTTCAA CCTGTTCTCT ACTAAAGACT CTTCTGCTGC TTGGGACGAA ACCCTGCTGG ACAAATTCTA CACTGAACTG TACCAGCAAC TCAACGACCT CGAGGCTTGT GTTATTCAGG GCGTTGGTGT TACCGAACT CCGCTGATGA AAGAGGATAG CATCCTGGCT GTTCGCAAGT ATTTCCAGCG TATCACTCTT TACCTGAAGG AAAAGAAGTA TAGCCCGTGT GCTTGGGAAG TTGTTTCGTGC TGAGATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCTAC TAACCTGCAG GAATCTCTGC GTTCTAAGGAA TGTG ATCTGCCGCA GACCCACTCC CTGTCTAACC GTCGTA CTCT

LT 6164 B

		GATGATCATG	GCACAGATGG	GTCGTATCTC
		TCCTTTCTCC	TGCCTGAAGG	ACAGACATGA
		CTTTGGATTT	CCTCAGGAGG	AGTTTGATGG
		CAACCAGTTC	CAGAAGGCTC	AAGCCATCTC
		TGTCCTCCAT	GAGATGATCC	AGCAGACCTT
		CAATCTCTTC	AGCACAAAGG	ACTCATCTGC
		TACTTGGGAT	GAGACACTTC	TAGACAAATT
		CTTTACCAGC	AGCTGAATGA	CCTGGAAGCC
		TGTATGATGC	AGGAGGTTGG	AGTGGAAGAC
		ACTCCTCTGA	TGAATGTGGA	CTCTATCCTG
		ACTGTGAGAA	AATACTTTCA	AAGAATCACT
		CAGAGAAGAA	ATACAGCCCT	TGTGCATGGG
		AGGTTGTCAG	AGCAGAAATC	ATGAGATCCT
		AGCAAACTTG	CAAGAACGTT	TACGTCGTAA
		GGAATAA		
9	IFNa5-OSM	ATGTGTG	ATCTGCCGCA	GACCCACTCC
		CTGTCTAACC		
		GTCGTACTCT	GATGATCATG	GCACAGATGG
		GTCGTATCTC	TCCTTTCTCC	TGCCTGAAGG
		ACAGACATGA	CTTTGGATTT	CCTCAGGAGG
		AGTTTGATGG	CAACCAGTTC	CAGAAGGCTC
		AAGCCATCTC	TGTCCTCCAT	GAGATGATCC
		AGCAGACCTT	CAATCTCTTC	AGCACAAAGG
		ACTCATCTGC	TACTTGGGAT	GAGACACTTC
		TAGACAAATT		
		CTACTGAA	CTTTACCAGC	AGCTGAATGA
		CCTGGAAGCC	TGTATGATGC	AGGAGGTTGG
		AGTGGAAGAC	ACTCCTCTGA	TGAATGTGGA
		CTCTATCCTG	ACTGTGAGAA	AATACTTTCA
		AAGAATCACT		
		CTCTATCTGA	CAGAGAAGAA	ATACAGCCCT
		TGTGCATGGG	AGGTTGTCAG	AGCAGAAATC
		ATGAGATCCT	TCTCTTTATC	AGCAAACTTG
		CAAGAACGTT		
		TACGTCGTAA	GGAAGCG	GCTATAGGCA
		GCTGCTCGAA		
		AGAGTACCGC	GTGCTCCTTG	GCCAGCTCCA
		GAAGCAGACA	GATCTCATGC	AGGACACCAG
		CAGACTCCTG	GACCCCTATA	TACGTATCCA
		AGGCCTGGAT	GTTCCCTAAC	TGAGAGAGCA
		CTGCAGGGAG	CGCCCCGGGG	CCTTCCCCAG
		TGAGGAGACC	CTGAGGGGGC	TGGGCAGGCG
		GGGCTTCCTG	CAGACCCTCA	ATGCCACACT
		GGGCTGCGTC	CTGCACAGAC	TGGCCGACTT
		AGAGCAGCGC	CTCCCCAAGG	CCCAGGATTT
		GGAGAGGTCT	GGGCTGAACA	TCGAGGACTT
		GGAGAAGCTG	CAGATGGCGA	GGCCGAACAT
		CCTCGGGCTC	AGGAACAACA	TCTACTGCAT
		GGCCCAGCTG	CTGGACAAC	CAGACACGGC
		TGAGCCCACG	AAGGCTGGCC	GGGGGGCCTC
		TCAGCCGCCC	ACCCCCACCC	CTGCCTCGGA
		TGCTTTTCAG	CGCAAGCTGG	AGGGCTGCAG
		GTTCTGTCAT	GGCTACCATC	GCTTCATGCA
		CTCAGTGGGG	CGGGTCTTCA	GCAAGTGGGG
		GGAGAGCCCG	AACCGGAGCC	GGAGATAA
10	OSM-IFNa5	ATGGCG	GCTATAGGCA	GCTGCTCGAA
		AGAGTACCGC		

GTGCTCCTTG	GCCAGCTCCA	GAAGCAGACA
GATCTCATGC	AGGACACCAG	CAGACTCCTG
GACCCCTATA	TACGTATCCA	AGGCCTGGAT
GTTCCCTAAC	TGAGAGAGCA	CTGCAGGGAG
CGCCCCGGGG	CCTTCCCCAG	TGAGGAGACC
CTGAGGGGGC	TGGGCAGGCG	GGGCTTCCTG
CAGACCCTCA	ATGCCACACT	GGGCTGCGTC
CTGCACAGAC	TGGCCGACTT	AGAGCAGCGC
CTCCCCAAGG	CCCAGGATTT	GGAGAGGTCT
GGGCTGAACA	TCGAGGACTT	GGAGAAGCTG
CAGATGGCGA	GGCCGAACAT	CCTCGGGCTC
AGGAACAACA	TCTACTGCAT	GGCCCAGCTG
CTGGACAAC	CAGACACGGC	TGAGCCCACG
AAGGCTGGCC	GGGGGGCCTC	TCAGCCGCC
ACCCCCACCC	CTGCCTCGGA	TGCTTTTCAG
CGCAAGCTGG	AGGGCTGCAG	GTTCTGCAT
GGCTACCATC	GCTTCATGCA	CTCAGTGGGG
CGGGTCTTCA	GCAAGTGGGG	GGAGAGCCCG
AACCGGAGCC	GGAGA TGTG	ATCTGCCGCA
GACCCACTCC	CTGTCTAACC	GTCGTACTCT
GATGATCATG	GCACAGATGG	GTCGTATCTC
TCCTTTCTCC	TGCCTGAAGG	ACAGACATGA
CTTTGGATTT	CCTCAGGAGG	AGTTTGATGG
CAACCAGTTC	CAGAAGGCTC	AAGCCATCTC
TGTCCTCCAT	GAGATGATCC	AGCAGACCTT
CAATCTCTTC	AGCACAAAGG	ACTCATCTGC
TACTTGGGAT	GAGACACTTC	TAGACAAATT
CTTTACCAGC	AGCTGAATGA	CTACACTGAA
TGTATGATGC	AGGAGGTTGG	CCTGGAAGCC
ACTCCTCTGA	TGAATGTGGA	AGTGGAAGAC
ACTGTGAGAA	AATACTTTCA	CTCTATCCTG
CAGAGAAGAA	AAGAATCACT	CTCTATCTGA
AGGTTGTCAG	ATACAGCCCT	TGTGCATGGG
AGCAAACCTG	AGCAGAAATC	ATGAGATCCT
	TCTCTTTATC	
	TACGTCGTAA	GGAATAA

Paprastai koduojanti seka gali būti raiškos vektoriaus dalis. Čia aprašytos nukleotidų sekos, tarp jų ir šio išradimo nukleotidų sekos, gali būti vektoriuje, kuriame nukleotidų seka yra funkciškai susieta su reguliacinėmis sekomis, galinčiomis užtikrinti tinkamo šeimininko organizmo nukleotidų sekos ekspresiją.

Siekiant, kad vyktų šio išradimo sulietų baltymų ekspresija, tinkama ląstelė šeimininkė gali būti transformuota, kaip aprašyta toliau, su vektoriais, skirtais naudoti pagal šį išradimą.

Vektoriaus, pvz., plazmidės, kosmidės ar fago vektoriaus pasirinkimas dažnai

priklauso nuo ląstelės šeimininkės, į kurią jis yra įterptinas. Tinkami vektoriai yra pET21b+, pET28a+, pUC57/T ir pT7, pirmenybę suteikiant pET21b+.

Skirti naudoti šiame išradime vektoriai gali turėti vieną ar daugiau atrankos markerio genų, tokių kaip genai, suteikiantys atsparumą antibiotikams, pvz., ampicilinui, kanamicinui, chloramfenikoliui arba tetraciklinui. Alternatyviai, atranka gali būti vykdoma atliekant kotransformaciją.

Vektoriai gali būti naudojami *in vitro*, pvz., gaminant RNR, arba siekiant transfekuoti, transformuoti, transdukuoti arba infekuoti ląstelę šeimininkę.

Taigi toliau išradimo įgyvendinimas numato nukleotidų sekų gavimo būdą, įterpiant šio išradimo nukleotidų seką (DNR fragmentą) į replikuotis galintį vektorių, jį įterpiant į atitinkamą ląstelę šeimininkę ir auginant šeimininko ląsteles sąlygomis, užtikrinančiomis vektoriaus replikaciją.

Vektorius gali papildomai turėti nukleotidų seką, leidžiančią jam replikuotis konkrečioje ląstelėje šeimininkėje. Tokių sekų pavyzdžiai yra plazmidžių pUC19, pACYC177, pUBHO, pE194, pAMBI, pIJ702 ir pBR322 replikacijos pradžios sekos.

Koduojančios IFNa5 sulietą baltymą nukleotidų sekos raiška taip pat gali būti sustiprinta, pasirenkant heterologines reguliacines sritis, pvz., promotoriaus, sekrecijos lyderinę ir terminatoriaus sritis.

Pageidautina, kad šio išradimo nukleotidų seka būtų funkciškai susieta bent su promotoriumi. Tinkamų promotorių, skirtų valdyti nukleotidų sekos transkripciją tinkamose bakterijų ląstelėse šeimininkėse, pavyzdžiai yra gerai žinomi šioje srityje.

Siūlomo išradimo įgyvendinimas numato ląsteles šeimininkes, transformuotas arba transfekuotas naudojant nukleotidų seką, kuri ekspresuoja chimerinį baltymą kaip čia aprašyta. Pasirinktinai suderinamos su minėtu vektoriumi ląstelės, kurios gali būti prokariotinės (pvz., bakterinės), grybų, mielių arba augalų ląstelės. Geriau, kad ląstelės šeimininkės būtų prokariotinės.

Tinkamų bakterinių organizmų šeimininkų pavyzdžiai yra gramteigiamų arba gramneigiamų bakterijų rūšys.

Tinkamas bakterinės ląstelės šeimininkės apima *Escherichia coli*. Tinkami *E. coli* kamienai apima BL21, BL21 (DE3), Rosetta gami-2, JMI09, K12 ir K802, optimaliai BL21 (DE3) ir Rosetta gami-2.

Siekiant efektyvesnės raiškos, ląstelės šeimininkės genotipas gali būti modifikuotas. Ląstelės šeimininkės modifikacijų pavyzdžiai apima proteazių delecijas, papildymą retomis tRNR, citoplazmos redukuojančio potencialo modifikaciją, siekiant palengvinti disulfidinių ryšių formavimąsi, pvz., tioredoksino reduktazės (trxB) ir glutationo oksidoreduktazės (gor) mutacijas.

Pvz., *E. coli* ląstelė šeimininkė gali ekspresuoti retų tRNR perteklių, kad būtų pagerinta heterologinių baltymų raiška, kaip parodė ir aprašė Kane [Curr. Opin. Biotechnol. (1995), 6, 494–500 „Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*“]. Ląstelėje šeimininkėje gali trūkti kelių redukuojančių fermentų, dėl ko susidarytų palankesnės sąlygos formuoti stabiliems disulfidiniams ryšiams, kaip nurodė Bessette [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96, 13703–13708 „Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm“].

Konkrečiu išradimo įgyvendinimo atveju *E. coli* ląstelė šeimininkė gali būti kamienas, pasižymintis proteazių trūkumu, toks kaip *E. coli* lon/omp kamienas su T-proteazių trūkumu, optimaliai *E. coli* BL21 kamienas, geriausia *E. coli* BL21 (DE3) kamienas.

Vienas iš transformuotų šio išradimo *E. coli* šeimininkų turėjo raiškos vektorių, paruoštą iš pET21b+ (Novagene).

Pagal siūlomą išradimą minėtas sulietas genas buvo klonuotas į pET21b+ vektorių už ankstyvojo bakteriofago T7 promotoriaus. Laikoma, kad genas yra skaitymo rėmelyje nuo promotoriaus, lac operonas turi būti prieš T7 promotorių, ir norimo sulieto konstrukto, kuriame yra atviras skaitymo rėmelis, raiška griežtai kontroliuojama ir nutraukiama T7 terminatoriumi.

Pagrindinis išradimo aspektas yra IFNa5 sulieto baltymo gamybos būdas, taikant ekspresiją IFNa5 produkuojančioje *E. coli* ląstelėje šeimininkėje, kur būdas apima tokias stadijas:

a) paruošia *E. coli* ląsteles šeimininkes, produkuojančias minėtą IFNa5 sulietą baltymą;

b) *E. coli* ląsteles šeimininkes, produkuojančias IFNa5 sulietą baltymą, kultivuoja sąlygomis, kuriomis efektyviai vyksta minėto IFNa5 sulieto baltymo raiška minėtoje rekombinantinėje *E. coli* ląstelėje šeimininkėje, esančioje tinkamoje fermentacijos terpėje, kur fermentacijos terpė apima gyvūninės arba mielių kilmės komponentus;

c) išskiria ir grynina gautą IFNa5 sulietą baltymą.

Konkrečiu išradimo įgyvendinimo atveju minėtas rekombinantinis IFNa5 sulietas baltymas, kuris gali būti gaminamas išradimo būdu, yra IFNa5 sulietas baltymas, kurio vienas iš suliejimo partnerių yra iš esmės identiškas natyviame IFNa5, t. y. baltymas, kurį gamina *E. coli* ląstelė šeimininkė, transformuota genu, koduojančiu chimerinį IFNa5 sulietą baltymą, arba genu, modifikuotu taip, kad koduotų baltymą, kurio (1) aminorūgščių seka yra bent iš esmės identiška natyvaus IFNa5, sulieto su kitu citokinu, aminorūgščių sekai, ir (2) kuris pasižymi biologiniu aktyvumu, būdingu natūraliajam IFNa5. Pirmenybė teikiama išradimo įgyvendinimo variantui, kur minėtas IFNa5 yra hIFNa5.

Konkretesniu atveju rekombinantinis IFNa5 sulietas baltymas, gaminamas pagal šį išradimą, yra chimerinis baltymas, kurio aminorūgščių seka atitinka bet kurią nurodytą SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4 arba SEQ ID No. 5.

E. coli ląstelę šeimininkę, gaminančią IFNa5 sulietą baltymą, galima gauti, naudojant įprastas klonavimo ir raiškos metodikas ir protokolus. [pvz., Sambrook et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Antras leid., CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, 1–3 t. (Ausubel F.M. et al., red.) John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York, 1994–1998].

Konkrečiu išradimo įgyvendinimo atveju IFNa5 koduojančio geno klonavimas ir raiška ir bakterinio kamieno, produkuojančio rekombinantinį IFNa5 baltymą (t. y. *E. coli* ląstelės šeimininkės, gaminančios IFNa5), konstravimas gali būti vykdomas klonuojant cDNR geną, koduojantį chimerinį geną, modifikuojant minėto geno DNR seką taip, kad optimizuotų jo raišką *E. coli*, konstruojant raiškos plazmidę, transformuojant pasirinktą plazmidę į tinkamo kamieno *E. coli* ir pasirenkant

raiškos/indukcijos sąlygas. 1, 2, 3 ir 4 pavyzdžiuose atskleidžiamos *E. coli* ląstelės šeimininkės, produkuojančios chimerinį hIFNa5 sulietą baltymą, konstravimo detalės.

Tam tikru atveju, kai *E. coli* ląstelė šeimininkė yra *E. coli* kamienas, pasižymintis proteazių trūkumu, toks kaip *E. coli* BL21 (DE3) kamienas, minėta ląstelė šeimininkė yra transformuojama naudojant vektorių, turinčiu seką, koduojančią IFNa5 sulietą baltymą kontrolės indukuojamu promotoriumi sąlygomis. Šiuo atveju baltymo raiškai, kaip minėta anksčiau, reikia įdėti induktoriaus, tokio kaip izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas (IPTG). Taigi konkrečiu atveju, kai *E. coli* ląstelė šeimininkė yra *E. coli* BL21 kamienas, pvz., *E. coli* BL21 (DE3) kamienas,, b) stadijos sąlygos apima indukciją. Rekombinantinio IFNa5 sulieto baltymo raiška indukuojama pasiekus atitinkamą biomasės prieaugį, naudojant tinkamą lac operono induktorių, tokį kaip laktozė ir pan. Optimaliai, naudoja IPTG 0,1–1 mM koncentracijos, geriausia 0,5 mM koncentracijos.

Išradimo būdo b) stadijos kultūrinė terpė pasirenkama iš sudėtinių terpių, tokių kaip LB, YPD, TB, M9 arba M9m, kur minėta kultūrinė terpė apima vieną arba daugiau azoto šaltinių, kurie pasirenkami iš grupės, apimančios amonio druskas, nitratus, triptoną, mielių ekstraktą ir amonio hidrochloridą; bei anglies šaltinį, kuris pasirenkamas iš grupės, susidedančios iš glicerolio, gliukozės, fruktozės ir pan., optimaliai yra gliukozė.

Sudėtinėje terpėje biomasės padidėjimas yra nuo 10 iki 50 g/l, geriau 25–40 g/l, skaičiuojant pagal drėgnų ląstelių masę, kai minėtos terpės parametrai tokie:

- sudėtinės terpės pH yra intervale 3,0–8,0, geriausia 6,0–6,8;
 - temperatūra yra 25 – 45 °C intervale, geriausia nuo 37 iki 42 °C; ir
 - ištirpęs deguonis yra 20–80 % įsotinimo, geriau 20–40 % įsotinimo; ir
- minėtą kultivavimą vykdo nuo 4 iki 10 valandų, geriau 6 valandas.

Tikslinio IFNa5 sulieto baltymo išskyrimas iš baltymą produkuojančio mikroorganizmo ir gryninimas, t. y. būdo pagal išradimą c) stadija apima:

- mikroorganizmo lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra sulieto baltymo, atskyrimą nuo tirpios baltymingos ląstelių medžiagos;
- netirpioje medžiagoje esančio sulieto baltymo tirpinimą;
- sulieto baltymo oksidavimą esant oksiduojančio/redukuojančio agento porai;
- tirpalo chromatografiją;
- išgryninto sulieto baltymo gavimą.

Konkrečiau IFNa5 sulieto baltymo išskyrimo ir gryninimo iš produkuojančio mikroorganizmo stadija apima:

- mikroorganizmo lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra rekombinantinio IFNa5 sulieto baltymo, atskyrimą nuo tirpios baltymingos medžiagos;
- netirpioje medžiagoje esančio rekombinantinio baltymo tirpinimą;
- IFNa5 sulieto baltymo oksidavimą naudojant oksiduotą glutationą esant redukuotojo glutationo;
- persivyniojusio tikslinio baltymo atskyrimą nuo chaotropinės medžiagos;
- tinkamų chromatografinio gryninimo būdų derinimą.

Optimaliai, įgyvendinant šio išradimo c) stadiją, netirpioje medžiagoje esantį IFNa5 sulietą baltymą tirpina naudojant chaotropinį agentą, geriausia esant vidutinei chaotropinio agento koncentracijai ir pH intervale 8,00–9,00. Tirpinimą galima atlikti naudojant guanidino hidrochloridą, kurio koncentracija 3,0–7,0 M, geriau 6,0–6,2 M.

Taikant šį išradimą, pirmenybė teikiama variantui, kuriame oksiduojančio/redukuojančio agentų pora yra oksiduoto/redukuoto glutationo pora, kur oksiduotos ir redukuotos glutationo formų molinis santykis yra nuo 1:5 iki 1:20, geriausia 1:20.

Be to, išradimas apima persivyniojusio IFNa5 sulieto baltymo atskyrimą nuo chaotropinės medžiagos, kai persivyniojusį IFNa5 sulietą baltymą atskiria nuo chaotropinės medžiagos hidrofobinės sąveikos chromatografija.

Optimaliai c) stadijos chromatografija yra trijų pakopų chromatografinio gryninimo derinys apimantis hidrofobinės sąveikos chromatografiją, katijonų mainų chromatografiją ir anijonų mainų chromatografiją.

Gali būti naudojamos įvairios hidrofobinės sąveikos chromatografijos kolonėlės, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš BioBeads SM-2, butil-S-Sefarozės, Capto Oktil, oktil- Sefarozės, fenil-Sefarozės, Capto Butil ir butil-Sefarozės.

Tinkamos įvairios anijonų mainų chromatografijos kolonėlės, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš UnoSphere Q, Macro-Prep High Q, Macro-Prep DEAE, Macro-Prep 25 Q, DEAE Sefacel, ANX Sefarozės 4 ir Q Sefarozės HP.

Gali būti naudojamos įvairios katijonų mainų kolonėlės, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš SP Sefarozės FF, SP Sefarozės HP, CM Sefarozės FF, TSK gel SP-5PW, TSK gel SP-5PW-HR, Toyopearl SP-650M, Toyopearl SP-650S, Toyopearl SP-650C, Toyopearl CM-650M, Toyopearl CM-650S, Macro-Prep High S support, Macro-Prep S support, Macro-Prep CM support ir kt.

Dar vienas išradimo aspektas - suformuluotas tikslinio sulietojo baltymo stabilus tirpalas, skirtas naudoti terapijoje ir stabilumo tyrimams. Išradimo sulietam baltymui farmaciniu požiūriu priimtini nešikliai yra vanduo, fiziologinis tirpalas, fiziologinis tirpalas acetatinio arba fosfatinio buferio pagrindu, dekstrozė, glicerolis ir panašiai, bei šių nešiklių deriniai. Daugeliu atveju į kompoziciją rekomenduotina pridėti izotoninių agentų, pvz., cukrų (manozės arba ramnozės), polialkoholių (manitolio, sorbitolio) arba mažos molekulinės masės junginius, kaip natrio chloridas arba glicinas. Visais atvejais laikoma, kad paruošiami tirpalai yra sterilūs: išgryninus, sulietojo molekulę integruojama į atitinkamą tirpiklį ir steriliai nufiltruojama.

Potencialios indikacijos yra susijusios su suliejimo partnerių indikacijomis, tai ūminis ir lėtinis hepatitas B ir C; vėžinės ligos, tokios kaip melanomos, limfomos ir sarkomos; platus virusinių infekcijų spektras (Artimųjų Rytų respiratorinio sindromo koronavirusas arba odos sutrikimai, pvz., odos ar gleivinės pakitimai, sukelti ŽPV infekcijų) bei reumatoidinio artrito priešuždegiminis gydymas.

Išradimo įgyvendinimas

Kaip minėta, pagrindinė šio išradimo strategija suliejant genus, yra išlaikyti tokią pačią aminorūgščių seką nenaudojant jokių linkerių (jungtųjų) tarp genų. Tai svarbu, siekiant išvengti tam tikro linkerinių sekų imunogeniškumo. Eksperimentų eiga

bendru atveju buvo įprasta: genų suliejimas genų inžinerijos būdais, DNR transformacija į rekombinantines *E. coli* ir klonų atranka, biosintezės optimizacija sudėtinėje terpėje ir galiausiai rekombinantinio baltymo gryninimo tinkamos schemos sukūrimas.

Visi genetiniai pakeitimai buvo atlikti įterpiant mutacijas, bet nekeičiant pagrindinės aminorūgščių sekos. Pagrindinė suliejimo klonavimo procedūrų strategija buvo PGR optimizacija, genų suliejimas lipniais galais ir tinkamo dydžio bei orientacijos geno produkto ekstrakcija, šio produkto įjungimas į laikiną arba raiškos plazmidę ir jos naudojimas įvairiems *E. coli* kamienams transformuoti. Buvo patikrinti visų gautų klonų intarpo dydis, orientacija, raiškos lygiai; atliktos atrinktų klonų restrikcinė analizė bei sekoskaita. Interferono alfa 5 dimerui sulieti buvo vykdyta speciali ir unikali klonavimo eiga (išsamus aprašymas pateikiamas 1 pavyzdyje ir Fig.1).

Sulietas baltymas buvo įterptas į kelias skirtingas plazmides, ieškant geriausiomis savybėmis pasižyminčio producento. Išbandytos pET21b+ ir pET28+ plazmidės, kurios abi yra skirtos griežtai kontroliuojamai ir efektyviai rekombinantinių baltymų ekspresijai. Tinkamo restrikcijos modelio ir intarpo dydžio perspektyvūs klonai toliau buvo panaudoti transformuojant du skirtingus *E.coli* kamienus, siekiant stabilios ekspresijos - *E.coli* BL21 (DE3) ir Rosetta gami-2. Pagrindinis kriterijus tolimesniam biosintezės optimizavimui buvo pasirinkto klono geriausias raiškos greitis ir plazmidės stabilumo santykis.

Biosintezė atlikta „Biorad“ bioreaktoriuose su oro padavimu ir temperatūros ir pH palaikymu. Kultivuota sudėtinėje terpėje, optimizavus jos sudėtį, priedus, temperatūros režimus, IPTG koncentraciją ir indukcijos trukmę. Viename sėkmingiausių eksperimentų (žr. 4 pavyzdį) sulietas IFNa5 baltymas buvo ekspresuotas tarpinių kūnelių pavidalu, akumuliuojus iki 40 % netirpios ląstelių baltymų frakcijos. Interferono alfa 5 sulietų baltymų biosintezę galima apibūdinti kaip serijinę biosintezę terpėje, praturtintoje mielių ekstraktu ir gliukoze kaip pagrindiniu anglies šaltiniu.

Optimizuojant biosintezės procesą atsižvelgta į keletą kriterijų. Nors pagrindinis biosintezės proceso įvertinimo kriterijus yra rekombinantinio baltymo išeiga, tačiau žemas plazmidės stabilumas gali būti lemiamasis parametras biosintezės sąlygų pakeitimui, net ir paaukojant baltymo išeigą. Žemas plazmidės stabilumas, stebimas pradiniuose biosintezės optimizavimo etapuose, gali sąlygoti

produkuojančių *E. coli* ląstelių kaupimąsi, kas apsunkina gryninimo procesą, taigi ir išeiga bus mažesnė. Naudojant *E. coli* Rosetta gami-2 kamieną, sulietą baltymą galima gauti ląstelės baltymo tirpioje frakcijoje. Tokia praktika pageidautina, kai IFNa5 baltymas suliejamas su citokinu, kurio apsunkintas baltymo susivyniojimas. Optimizavus biosintezės procesą, pavyko sukurti rekombinantinio baltymo gamybos technologija su maksimaliai geromis biosintezės proceso parametrų reikšmėmis. Detalesnė informacija pateikta 5 pavyzdyje.

Gryninimui atlikti buvo derinami ir optimizuojami įvairūs jonų mainų ir hidrofobinės sąveikos sorbentai. Gryninimo procesas buvo kruopščiai atiderintas taip, kad atitiktų šių sulietų baltymų gryninimo specifiką. Po denatūracijos etapo vykstantis baltymų susivyniojimo procesas didele dalimi priklauso nuo peptido fragmentų polinkio susivynioti tam tikromis formomis. Sulietų baltymų atveju visuose gryninimo pakopose ir atliekant jų analizę RP-HPLC metodu pastebėta, kad aplink tikslinio baltymo pagrindinę smailę susiformuoja netinkamai susivyniojusio baltymo grupė. Buvo atlikti pradiniai sulieto baltymo išskyrimo iš tarpinių kūnelių ir gryninimo tyrimai. Didžiausių sunkumų kilo dėl galimos tirpikliui prieinamų –S-S– ryšių (esančių kilpos ribose) sąveikos galimo persiklojimo, dėl ko susidaro nežinomos sudėties junginiai (aptikti RP-HPLC), kurie sunkiai atskiriami nuo pagrindinės suliejimo formos. Siekiant išvengti šių formų, buvo pasirinkta susivyniojimo ir gryninimo schema su mažesnėmis bendro baltymo išeigomis, paaukojant išeigos dalį, kad pavyktų išsaugoti pagrindinę dalį korektiškai susivyniojusios frakcijos.

Visais tirtais atvejais persivyniojimas buvo pasiektas, praskiedžiant tarpinių kūnelių tirpalą iš viso 16 kartų. Tam tikslui 56 ml tarpinių kūnelių (IB) tirpalo buvo įpilta į refoldingo buferį, švelniai maišant galutinį tirpalą nustatytą laiką +4 °C temperatūroje. Refoldingo buferis paprastai turėjo 25 mM glicino/NaOH buferio nustatytos pH reikšmės; buferio sudėtyje buvo 1,2 M NaCl, 0,5 M L-Arg ir pasirinkta redukuoto/oksiduoto glutationo pora arba oksiduotas glutationas, papildantis likutinį DTT kaip redukuojančią medžiagą. Persivyniojimo sąlygos optimizuotos tiriant pH įtaką, būtent pH 7,0; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5, esant GSH/GSSG moliniam santykiui ir koncentracijai = 2,5 mM : 0,25 mM, bei GSH/GSSG molinio santykio ir koncentracijos įtaką, būtent šiam santykiui esant 2,5 mM : 0,25 mM; 5,0 mM : 0,25 mM; 5,0 mM : 0,5 mM; 10 mM : 1,0 mM, kai pH reikšmė 9,6. Persivyniojimo efektyvumas buvo kontroliuotas RP-HPLC. Kaip optimizuotos pasirinktos tokios persivyniojimo sąlygos,

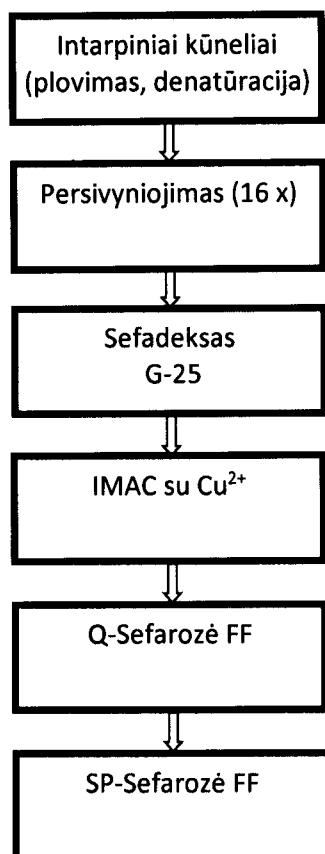
kuriomis gautas didžiausias korektiškai susivyniojusios suliejimo formos procentas, būtent GSH/GSSG molinis santykis ir koncentracija = 2,5 mM : 0,25 mM.

Sulietam IFNa2b-IFNa5 baltymui gauti tarpiniai kūneliai buvo redukuoti naudojant DTT, o persivyniojimas pasiektas pridėdant 0,5 mM oksiduoto glutationo. Kiti refoldingo buferio (1,2 M NaCl, 0,5 M L-Arg) priedai liko tie patys. Tačiau pastangos gauti didesnį sulieto baltymo kiekį nepasiteisino proceso išeigos požiūriu. Išradimo autoriams pavyko nustatyti, kad į refoldingo buferį pridėjus amonio sulfato vietoj NaCl, galima beveik du kartus padidinti korektiškai susivyniojusio sulieto baltymo kiekį. Atsižvelgiant į tai, tolesnis suliejimo procesas buvo atliekamas, į refoldingo buferį pridėdant 0,5 M amonio sulfato. Šitoks druskos pakeitimas persivyniojimo proceso metu sąlygojo ir pradinio suliejimo chromatografijos etapo pakeitimą, kadangi pirmoji chromatografinio gryninimo su fenil-Sefarozės FF kolonėle pakopa anksčiau buvo atiderinta, naudojant NaCl. Fenil-Sefarozės FF kolonėlė yra skirta persivyniojusio baltymo tirpalui atskirti nuo likutinio guanidino hidrochlorido (GdmCl). Todėl naudojant fenil-Sefarozės FF kolonėlę, t. y. pakraunant persivyniojusį baltymą į kolonėlę, nupusiausvirintą su 1,5 M NaCl, tapo būtina NaCl pakeisti į amonio sulfatą arba atrasti tinkamas šios kolonėlės eksploatavimo sąlygas, naudojant pusiausvirinimo buferį su tinkamai parinktos koncentracijos amonio sulfatu. Buvo tiriamas fenil-Sefarozės FF kolonėlės darbas, į pusiausvirinimo buferį pridėdant įvairios koncentracijos amonio sulfato. Buvo nustatyta, kad persivyniojusio baltymo chromatografija fenil-Sefarozės FF kolonėlėje yra įmanoma, naudojant 1,25 M amonio sulfatą. Tokiu atveju, atliekant renatūracijos stadiją su 0,5 M amonio sulfato priedais, sekantį chromatografijos per fenil-Sefarozės FF kolonėlę etapą galima atlikti, praleidžiant Sefadekso G-25 kolonėlę. Pasirodė, kad pakanka pridėti amonio sulfato į persivyniojusio baltymo tirpalą ir pusiausvirinimo buferį iki 1,25 M koncentracijos ir atlikti chromatografiją analogiškai, kaip ir naudojant NaCl. Fenil-Sefarozės chromatografijos kolonėlė buvo nupusiausvirinama naudojant 20 mM Tris HCl, 1,5 M NaCl, pH = 8,2, laidumas 115,1 mS/cm. Po chromatografijos per Sefadekso G-25 kolonėlę 2500 ml sulieto IFNa2b-IFNa5 baltymo tirpalo buvo pakauta į kolonėlę, kurios eliuavimo srauto greitis 20 ml/min, ir išplauta su 10 mM TrisHCl, pH = 9,2, laidumas 1196 μ S/cm.

Po fenil-Sefarozės atliekama Q-Sefarozės chromatografija, pusiausvirinimui naudojant 20 mM Tris-HCl, 0,05 M NaCl, pH 8,8. Apjungtos baltymo frakcijos po fenil-Sefarozės, pakoregavus pH iki 8,8 su 6 M HCL, laidumas 8 mS/cm, pakrautos į

kolonėlę. Desorbcijos gradientas taikytas kaip 20 mM TrisHCl, linijinis gradientas nuo 0,05 iki 0,25 M NaCl, pH 8,8. Surinkta frakcija buvo chromatografuota per SP-Sefarozę. SP-Sefarozės kolonėlė buvo nupusiausvirinta naudojant 20 mM CH₃COONa, 100 mM NaCl, pH 5,4. Mėginys pakrautas, su 6 M HCl pakoregavus pH iki 5,4, laidumą – iki 9,5 mS/cm. Desorbcija iš kolonėlės vykdyta su 20 mM CH₃COONa gradientu nuo 50 mM iki 0,25 M NaCl, pH 5,4. Atlikus SP-Sefarozės FF chromatografiją, į apjungtas frakcijas, turinčias sulieto baltymo, pridėjus 1 dalį (10:1 pagal tūrį) koncentruoto fosfatinio buferio (250 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,0), pH pakoreguotas iki 7,0 ir tirpalas koncentruotas, naudojant Millipore Ultracel (10 MWCO) centrifugos filtrus. Po koncentravimo buferis pakeistas į PBS (25 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,0). Pakeitus buferį, bendras baltymo kiekis buvo nustatytas naudojant baltymų tyrimo rinkinį Pierce 660. Baltymo tirpalas nufiltruotas naudojant Mustang E filtrą ir sterilioje aplinkoje (laminarinio oro srauto gaubtas) išpilstytas alikvotinėmis dalimis į 1 ml indelius (galutinė koncentracija – 1,005 mg/ml). Indeliai buvo užšaldomi ir laikomi -80 °C temperatūroje. Paimti mėginiai RP-, SEC-HPLC, bendram baltymo ir endotoksinų kiekiui nustatyti.

Sulietiems IFNa5-OSM ir OSM-IFNa5 baltymams buvo įvertintas amonio sulfato poveikis sulietų baltymų renatūracijos išėjimui. Visi renatūracijos buferiai buvo sudaryti iš 25 mM glicino/NaOH buferių, turinčių 0,5 M L-Arg, pH 9,6, 5 mM redukuoto (GSH) ir 0,25 mM oksiduoto (GSSG) glutationo. Refoldingo buferyje padidinus amonio sulfato koncentraciją, gauta didesnė renatūruoto baltymo išėja, palyginus su ankstesnę, pridėdant 1,2 M NaCl. Toliau pateikiama schema, optimizuota IFNa5 ir OSM sulietiems baltymams:



50 g biomasės resuspenduojama 500 ml 0,1 M Tris-HCl buferio (pH 7,4), kurio sudėtyje yra 2 mM EDTA, 25 mM DTT, 250 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, ir suardoma naudojant ultragarsą. Suardymas atliekamas naudojant 1:1 impulsą, 40 % amplitudę; 10 g suardymo laikas – 25 min. Gauta suspensija 30 min. centrifuguojama 12000 aps./min. greičiu, ir granulės, turinčios intarpinių kūnelių, užšaldomos -20 °C temperatūroje.

Intarpinių kūnelių plovimas atliekamas tokiu būdu:

Du kartus su I plovimo buferiu: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,1% polisorbato-80, pH 7,4, kiekvieną kartą su 500 ml;

II plovimo buferis: 10 mM Tris-HCl, 6 M karbamido, pH 8,0, 500 ml;

III plovimo buferis: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 ml

Po kiekvieno plovimo intarpiniai kūneliai IB buvo centrifuguojami 10000 aps./min. greičiu Beckman centrifugoje.

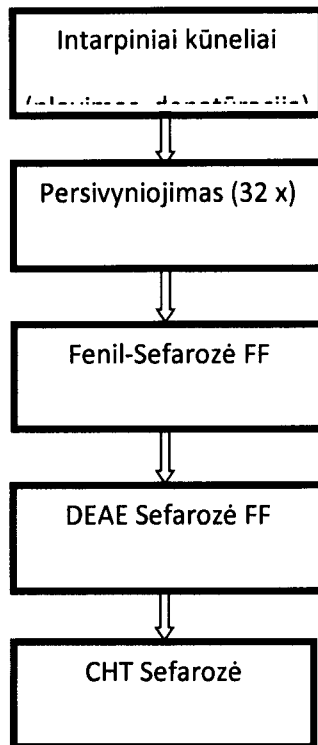
Preliminariai išplauti IB buvo 2 val. tirpinami 300 ml 25 mM Gly/NaOH buferyje,

pH 8,7, turinčiame 2 mM EDTA, 6 M GdmCl, 20 mM DTT (297 mS/cm, +4°C), ir po to 30 min. centrifuguojami 9500 aps./min. greičiu Beckman centrifugoje.

Persivyniojimas vyko 2 l talpos Duran tipo karščiui atsparaus stiklo laboratorinėse stiklinėse, uždengtose tampiāja plėvele. Ištirpinti (soliubilizuoti) intarpiniai kūneliai buvo 10 kartų atskiedžiami refoldingo buferiu (25 mM Gly/NaOH, 0,5 M arginino, 0,25 M (NH₄)₂SO₄ 2,5 mM GSH, 0,25 mM GSSG, pH 9,6), iki galutinio 3000 ml tūrio. Persivyniojimas vyksta apytikriai 64 val. Po persivyniojimo baltymo tirpalas 30 min. centrifuguojamas +4 °C temperatūroje 9500 aps./min. greičiu Beckman centrifugoje. Chromatografijai su Sefadeks G-25 visas po persivyniojimo gautas tirpalas buvo pakraunamas į kolonėlę ir išplaunamas 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl (pH 9,0) iki 1,2 kolonėlės tūrio. Po druskų pašalinimo atlieka baltymo tirpalo chelatinę Sefarozės chromatografiją. Chelatinė Sefarozės FF terpė plaunama 50 mM EDTA tirpalu, 2 CV, 0,1 M HCl tirpalu, 2 CV, vandeniu, iki pH reikšmė viršys 5,0 ir įkraunama Cu(II) jonais, pridėjus 0,2 M Cu₂SO₄ tirpalo, 2 CV. Kolonėlė plaunama vandeniu ir nupusiausvirinama 20 mM TrisHCl buferiu (pH 7,0), kurio sudėtyje yra 0,5 M NaCl, esant mažam srauto greičiui 10 ml/min. 3250 ml baltymo tirpalo (pH 7,0), iš kurio pašalintos druskos, pakrauna į kolonėlę. Nesurišti baltymai išplaunami su 20 mM TrisHCl, 0,5 M NaCl, pH 7,0, 2 CV. Eliuavimą pradeda su 20 mM TrisHCl, 0,5 M NaCl, 15 CV, gradientu į 100 mM imidazolą, pH 7,0. Surinktas frakcijas, patikrinus ar jose yra sulietų baltymų, pakrauna į Q-Sefarozės FF terpę. Ši kolonėlė nupusiausvirinama su 20 mM TrisHCl, 70 mM NaCl, pH 9,0, 10 CV. Nesurištų baltymų išplovimas: 20 mM TrisHCl, 70 mM NaCl, pH 9,0, 2 CV; ir eliuavimas atliekamas su 20 mM TrisHCl, 10 CV gradientu iki 300 mM NaCl, pH 9,0. Baigiamajam gryninimo etapui pasirenka CM Sefarozę. Kolonėlę nupusiausvirinama su 20 mM natrio acetatu, 50 mM NaCl, pH 5,5, 10 CV. Galutinį baltymo eliuavimą atlieka su 20 mM natrio acetatu, 15 CV gradientu iki 500 mM NaCl, pH 5,5. Apjungtos frakcijos, turinčios sulietų baltymų, dedamos į 1 dalį (10:1 pagal tūrį) koncentruoto fosfatinio buferio (250 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,0), pH koreguojamas iki 7,0 ir tirpalas koncentruojamas, naudojant Millipore Ultracel (10 MWCO) centrifugos filtrus. Po koncentravimo buferį pakeičia į PBS (25 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,0). Pakeitus buferį, bendras baltymo kiekis nustatomas naudojant baltymų tyrimo rinkinį Pierce 660. Baltymo tirpalą nufiltruoja naudojant Mustang E filtrą, ir sterilioje aplinkoje (laminarinio oro srauto gaubtas) išpilsto alikvotinėmis dalimis į 1 ml indelius (galutinė koncentracija – 1,005 mg/ml). Indelius užšaldo ir laiko -80 °C

temperatūroje. Paimami mėginiai RP-, SEC-HPLC, bendram baltymo ir endotoksinų kiekiui nustatyti.

Sulietam IFNa5-IFNa5 baltymui gauti buvo optimizuota trečioji gryninimo schema:



Atskirtų intarpinių kūnelių preliminarų plovimą atlieka pagal keturių pakopų procedūrą naudojant: I plovimo buferiu 10 mM Tris-HCl buferį, kurio sudėtyje yra 1 M NaCl, 0,1% polisorbato-80, pH 7,4; II plovimo buferiu 10 mM Tris-HCl buferį, kurio sudėtyje yra 6 M karbamido, pH 8,0; III plovimo buferiu 10 mM Tris-HCl buferį, pH 8,0.

Tirpinimo buferis susideda iš 25 mM Gly/NaOH buferio, kurio sudėtyje yra 2 mM EDTA, 6 M GdmHCl, 20 mM DTT, pH 9,6, 0-10°C. Tirpinimo santykis: intarpiniai kūneliai (IB), išskirti iš 1 g biomasės, buvo tirpinami 2 val. +4°C temperatūroje 6 ml tirpinimo buferio, ir po šios stadijos buvo 30 min. centrifuguojami 9500 aps./min. greičiu.

Intarpinių kūnelių (IB) plovimas buvo atliekamas tokiu būdu:

a) intarpiniai kūneliai du kartus plaunami I plovimo buferiu (turinčiu 1 M NaCl ir 0,1 % polisorbato 80 priedų);

b) Trečiąjį plovimą atlieka naudojant II buferį (turintį 6 M karbamido priedą);

c) Ketvirtąjį plovimą atlieka su III buferiu, 10 mM Tris-HCl buferiu (neturiniu priedu, pH 8,0). Tai paskutinė tarpinių kūnelių preliminarus plovimo stadija;

d) Po kiekvieno iš šių plovimo etapų tarpinius kūnelius 30 min. centrifuguoja 4 °C temperatūroje 9500 aps. / min. greičiu su Beckman J-10 rotorium.

Preliminarus plovimo santykis: IB, išskirtiems iš 1 g drėgnos biomasės naudojama 10 ml buferio.

Tolimesniam gryninimo schemos tobulinimui kaip pagrindinė procedūra buvo pasirinktas sulietų baltymų persivyniojimas, pridėdant 0,5 M amonio sulfato ir laikantis 32 x skiedimo koeficiento. Nors su natrio sulfato priedais iš fenil-Sefarozės FF kolonėlės galima gauti daugiau baltymo, natrio sulfato naudojimo buvo atsisakyta dėl polinkio kristalizuotis šaltomis kambario sąlygomis. Chromatografijos su fenil-Sefarozės FF procesas buvo atliktas kaip anksčiau aprašyta dėl IFNa2b-IFNa5 gryninimo. DEAE chromatografijai atlikti naudota dviejų buferių sistema: A buferis (20 mM Tris-HCl, pH 8,8, laidumas 243 μ S/cm) ir B buferis (20 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 8,8, laidumas 84,4 mS/cm). Kolonėlė nupusiausvirinama naudojant 20 mM Tris-HCl, 0,05 M NaCl, pH 8,8, laidumas 7 mS/cm, 25°C, 5 CV. Eliuavimas buvo atliktas su 20 mM TrisHCl gradientu nuo 0,05 iki 0,4 M NaCl, pH 8,8.

Plovimas: 20 mM TrisHCl, 0,05 M NaCl, pH 8,8, laidumas 7 mS/cm, 25 °C, 2 CV. Baigiamajame chromatografijos etape naudotas CHT keraminis hidroksiapatito I tipo sorbentas. Šioje chromatografijoje kaip A buferis naudotas dejonizuotas vanduo, ir kaip B buferis – 500 mM H_3PO_4 , pH 6,4. Kolonėlė nupusiausvirinama su 5 mM H_3PO_4 , pH 6,4. Frakcijos po DEAE chromatografijos buvo praskiestos iki galutinės 5 mM fosfato koncentracijos naudojant 500 mM fosfatinį buferį (60 : 0,6), pH koreguotas iki 6,4. Desorbcija atlikta fosfato gradientu nuo 5 mM iki 250 mM, pH 6,4. Apjungtos frakcijos, turinčios sulietų baltymų, pridėtos į 1 dalies (10:1 pagal tūrį) koncentruotą acetatinį buferį (150 mM acetato, 150 mM NaCl, pH 5,2), pH koreguotas iki 5,2 ir tirpalas buvo koncentruotas, naudojant Millipore Ultracel (10 MWCO) centrifugos filtrus. Baltymo tirpalą nufiltruoja naudojant Mustang E filtrą ir sterilioje aplinkoje (laminarinio oro srauto gaubtas) išpilsto alikvotinėmis dalimis į 1 ml indelius (galutinė koncentracija – 1,005 mg/ml). Indelius užšaldo ir laiko -80°C temperatūroje. Paimami mėginiai RP-, SEC-HPLC, bendram baltymo ir endotoksinų kiekiui nustatyti.

Analizę sudarė proceso kontrolės būdai (tokie kaip SDS-PAGE, Western blot,

RP-HPLC) ir galutinio produkto savybių nustatymas (kaip RP-HPLC, SE-HPLC, peptidų žemėlapių sudarymas, aminorūgščių sekoskaita TOF masių spektrometrija ir biologinio aktyvumo įvertinimas).

PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys. IFNA5-IFNA5 homodimero klonavimo schema

Įprastoms klonavimo schemoms, naudojamoms genams sulieti, kai tikslas yra homodimerinis genas, būdingi keli neigiami aspektai. Šiuo konkrečiu atveju negalima panaudoti skirtingų geno A ir geno B savybių, ir taikant daugumą strategijų prarandamas tam tikras geno fragmentas. Šiame pavyzdyje taikoma speciali klonavimo schema (Fig.1), kuri gali būti panaudota panašiais homodimerinių genų suliejimo atvejais.

IFNa5 geno kaip N galinės dalies paruošimą suliejimui sudaro keli etapai. Pirmiausia PGR būdu atliekama genų amplifikacija, jo 5' gale pridodant NdeI vietą, ir iš jo 3' galo pašalinant TAG pabaigos (stop) kodoną (naudojami pradmenys IFNA5-FOR-NDE ir IFNA5-REV-(-STOP)). Antra, amplifikuotas ir išgrynintas IFNA5/N genas sukarpomamas naudojant AclI restrikcijos endonukleazę, iš geno 3' galo pašalinant 22 bazių porų. AclI vieta naudojama lipniojo galo ligavimui su IFNa5/C geno 3' galu.

IFNa5 geno kaip C galinės dalies paruošimą suliejimui sudaro PGR būdu atliekama genų amplifikacija, pridodant HindIII vietą jo 3' gale ir pašalinant iš 5' galo ATG pradžios (start) kodoną (naudojami pradmenys IFNA5-FOR-A5 ir IFNA5-REV-HIND). Naudojant tų pačių pradmenų porą prieš skaitymo rėmelio kryptį pridodama papildoma 30 bazių porų seka su komplementariąja IFNa5/N geno 3' galo seka (žr. 3 lentelę). Paskui amplifikuotas ir išgrynintas IFNa5/C genas sukarpomamas AclI restrikcijos endonukleaze. Jo pirmasis taikinytis yra pridėtojoje IFNa5/N sekoje, o antrasis taikinytis – jo 3' gale. Abu AclI sukarpytus genus ekvimoliniu santykiu ligavus tarpusavyje gauna sulieto geno konstruklą, kurį paskui ekstrahuoja iš agarozės gelio.

3 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	T _m
IFNA5-FOR-NDE	ATTATCATATGTGTGATCTGCCGCAGA	NdeI (CATATG)	63,9 °C
IFNA5-REV-(-stop)	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8 °C
IFNa5-A5-FOR	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC TGTGATCTGCCGCAGA	AclI (AACGTT)	>75,0 °C
IFNa5-REV-HIND	GACGTAAACGTTCTTGCTAAAAGCTTT TAA	AclI, HindIII	>75,0 °C

3 lentelėje pabrauktos sekos yra tiesioginio pradmens (CA[^]TATG) NdeI atpažinimo ir skaldymo vieta, o HindIII – atvirkštinių pradmenų (A[^]AGCTT) ir AclI (AA[^]CGTT) vietos, naudojamos genams sujungti. Paryškintoji seka – tai 24 bazės, koduojančios IFNa5/N geno galą, pridėtos prie IFNa5/C geno iš priekio.

Po ligavimo, jeigu klonų parinkimo etape pašalinami konkatamerai, gaunamas sulieto geno produktas, kuriam trūksta 22 bazių porų (7 aminorūgščių ir nėra STOP kodono). Norint atkurti visą seką, atliekamas antrasis etapas, kurį sudaro sekos sukarpymas-ligavimas. pET21b+ plazmidė, jau turinti IFNa5 geną, sukarpyama naudojant specialią restrikcijos endonukleazę, esančią IFNa5 gene – Bsu36I. Naudojant Bsu36I panašiai sukarpytas ir IFNa5-AclI-IFNa5 ligatas, ir 500 bazių porų vidinis geno fragmentas išgryninamas iš gelio. Paskui IFNa5/pET21b+ karkasas liguojamas su 500 bazių porų Bsu36I IFNa5-IFNa5 fragmentu ir transformuojamas į tarpinį E.coli JM109 kamieną. Kaip matyti klonavimo scheme (Fig.1), šiuo būdu atkuriamas viso ilgio geno dimeras su pradžios (start) ir pabaigos (stop) kodonais. Teigiami klonai papildomai patikrinami atliekant pilną restrikcijos schemos analizę. Patvirtintieji klonai retransformuojami į BL21(DE3) E.coli kamieną, patikrinama jų ekspresija ir atliekama sekoskaita.

2 pavyzdys. Sulietos IFNA2B-IFNA5 heterostruktūros klonavimo schema

IFNa2b geno paruošimą suliejimui sudaro PGR būdu atliekama genų amplifikacija, NdeI vietos pridėjimas 5' gale ir TAA pabaigos (stop) kodono pašalinimas iš 3' galo. Šiuo atveju PGR atliekama naudojant pradmenis IFNA2b-FOR-NDE ir

IFNa2B-REV-(-stop). Klonavimo schema pateikta Fig. 2. Amplifikuotas ir išgrynintas IFNA2b genas po to sukarpomamas, naudojant PstI restrikcijos endonukleazę, ir iš geno 3' galo pašalinama 10 bazių porų. PstI vieta panaudojama lipniojo galo ligavimui su IFNa5 genu. Analogiškai, IFNa5 geno paruošimą suliejimui sudarė PGR amplifikacija, HindIII vietos pridėjimas geno 3' gale, ir 22 bazių porų ilgio IFNa2b geno fragmento galo sujungiamas su PstI taikiniu (naudojant pradmenis IFNa5-FOR-A2b ir IFNa5-REV-HIND). Paskui amplifikuotas ir išgrynintas IFNa5 genas pridėtojoje IFNa2b sekoje karpomas naudojant PstI taikinį.

4 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	Tm
IFNA2b-FOR-NDE	TTAAC <u>CATATG</u> TGTGATCTGCCGCA	NdeI (CATATG)	61,8°C
IFNa2B-REV-(-stop)	TTCCTTAGAACGCAGAGATT <u>CCTGCAG</u> GTT	PstI (CTGCAG)	67,0°C
IFNa5-FOR-A2b	TTT<u>CTGCAGGAATCTCTGCGTTCTAAG</u>GAATGTGATCTGCCGCAGACC	PstI (CTGCAG)	75,8°C
IFNa5-REV-HIND	AATTA <u>AAGCTT</u> TTTATTCTTACGAC	HindIII (AAGCTT)	51,3°C

4 lentelėje pabrauktos sekos yra tiesioginio pradmens (CA[^]TATG) NdeI atpažinimo ir skaldymo vieta, o HindIII – atvirkštinių pradmenų (A[^]AGCTT), PstI (CTGCA[^]G) vietos buvo naudotos geno sujungimui. Paryškintoji seka – tai 30 bazių, koduojančių IFNa2b geno galą, kurios pridėtos prie IFNa5 geno iš priekio.

PstI sukarpyti produktai ekvimoliniais santykiais liguojami kartu su T4 DNR ligaze. Gautas mišinys gryninamas, iš gelio ištraukiant 1000 bazių porų ilgio fragmentą. Kadangi šis fragmentas yra bukais galais, jis buvo klonuotas į tarpinį vektorį pJET1.2, ir po to – į *E.coli* JM109 kamieną. Toks plazmidės ir kamieno derinys leido pJET plazmidėje sukurti teigiamus klonus, kurie paskui dukart sukarpomi, naudojant NdeI-HindIII. Dvigubai sukarpyto sulieto geno produktas pakartotinai išgryninamas su PGR gryninimo rinkiniu, ir paskui paruošiamas klonuoti į pasirinktą sukarpytą ir defosforilintą ekspresijos plazmidę pET21b+. Siekiant užtikrinti klono stabilumą, pirmasis liguotų produktų transformavimo etapas buvo atliktas į *E.coli* JM109 kamieną. Po pirmojo

klonavimo įtarpos dydis patikrinamas plazmidės DNR sukarpanant NdeI-HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Teigiami klonai papildomai patikrinami atliekant pilną restrikcijos schemos analizę. Patvirtintieji klonai retransformuojami į BL21(DE3) E.coli kamieną ir patikrinamas jų ekspresijos lygis. Atliekama patvirtintų klonų sekoskaita.

3 pavyzdys. Sulietos IFNA5-IFNA2B heterostruktūros klonavimo schema

IFNa5 geno paruošimą suliejimui sudaro PGR būdu atliekama genų amplifikacija, NdeI vietos pridėjimas 5' gale ir stop-kodono pašalinimas iš 3' galo, naudojant pradmenis IFNA5-FOR-NDE ir IFNA5-REV-(-stop). Panašiai ir IFNa2b geno paruošimą suliejimui sudaro geno amplifikacija PGR būdu, HindIII vietos pridėjimas geno 3' gale, ir prijungimas 14 bazių porų ilgio IFNa5 geno fragmento (naudojant pradmenis IFNa2b-FOR-A5 ir IFNa2b-REV-HIND). Šiuo atveju persidengianti PGR atliekama per nurodytą 14 bazių porų sritį, dėl ko gaunamas sulietų genų produktas. Pradmenys nurodyti toliau pateiktoje lentelėje.

5 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	Tm
IFNA5-FOR-NDE	ATTATCATATGTGTGATCTGCCGCA GA	NdeI (CATATG)	63,9°C
IFNA5-REV-(-stop)	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8°C
IFNA2B-FOR-A5	TACGTCGTAAGGAATGTGATCGCC GCA	nėra	68,9°C
IFNA2B-REV-HIND	AAAAAGCTTCTATTCTTAGAAC	HindIII (AAGCTT)	50,2°C

Persidengianti PGR atliekama dviem etapais: vienas etapas su mažos išeigos PGR, reakciją atliekant be pradmenų (persidengianti sritis veikia kaip laisvų 3'-OH grupių donorė), apimant tik IFNa5 ir IFNa2b PGR produktus. Sulietų genų produktą išgavus iš gelio, naudojant pradmenis IFNA5-FOR-NDE ir IFNA2B-REV-HIND atliekama pakartotinė amplifikacija. Po šio antrojo PGR etapo, produktas sukarpomamas naudojant restrikcijos endonukleazes NdeI ir HindIII ir klonuojamas į sukarpytą ir defosforilintą ekspresijos plazmidę pET21b+. Siekiant užtikrinti klono stabilumą, pirmasis liguotų produktų transformavimo etapas atliekamas į E.coli JM109 kamieną.

Po pirmojo klonavimo įtarpos dydis patikrinamas, plazmidės DNR sukarpanant NdeI-HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Teigiami klonai papildomai patikrinami atliekant pilną restrikcijos schemos analizę. Patvirtintieji klonai retransformuojami į BL21(DE3) E.coli kamieną ir patikrinamas jų ekspresijos lygis. Atliekama patvirtintų klonų sekoskaita.

4 pavyzdys. Sulietos IFNa5-OSM heterostruktūros klonavimo schema

IFNa5 geno paruošimą suliejimui sudaro PGR genų amplifikacija, NdeI vietos pridėjimas 5' gale ir TAG stop-kodono pašalinimas iš 3' galo (naudojami pradmenys IFNA5-FOR-NDE ir IFNA5-REV-(-stop)). Paskui amplifikuotas ir išgrynintas IFNa5 genas sukarpomamas, naudojant AclI restrikcijos endonukleazę, iš geno 3' galo pašalinama 10 bazių porų. AclI vieta panaudojama lipniojo galo ligavimui su OSM(196) genu.

OSM(196) geno paruošimą suliejimui sudaro PGR amplifikacija, HindIII vietos pridėjimas geno 3' gale ir 22 bazių porų ilgio IFNa5 geno fragmento galo sujungimas su AclI taikiniu. Po to amplifikuotas ir išgrynintas OSM(196) genas pridėtoje IFNa5 sekoje sukarpomamas naudojant AclI taikinį.

6 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	Tm
IFNA5-FOR-NDE	ATTATCATATGTGTGATCTGCCGCA GA	NdeI (CATATG)	63,9 °C
OSM-RSRR-REV-HIND	TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGG TT	HindIII (AAGCTT)	65,1 °C
IFNA5-REV-(-stop)	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8 °C
OSM-AAI-ACL	TTAACGTTTACGTCGTAAGGAAGC GGCTATAGGCAGCT	AclI (AAGCTT)	71,5 °C

Pabrauktos sekos yra tiesioginio pradmens (CA[^]TATG) NdeI atpažinimo ir skaldymo vieta, HindIII – atvirkštinio (A[^]AGCTT) ir AclI (AA[^]CGTT) vietos, naudojamos genams sujungti. Paryškintoji seka – tai 24 bazių, koduojančių IFNa5 geno galą, kurios pridėtos prie OSM(196) geno iš priekio.

AclI sukarpyti produktai ekvimoliniais santykiais liguojami kartu su T4 DNR ligaze. Gautas mišinys gryninamas, iš agarozės gelio ištraukiant 1100 bazių porų ilgio fragmentą. Pagrindinis skirtumas nuo 2 pavyzdžio yra tas, kad dėl skirtingų suliejamų genų dydžių iš korektiškos formos galima išskirti konkatamerines struktūras (veidrodinius IFNa5-IFNa5 ir OSM-OSM). Todėl tarpinio pJET1.2 klonavimo etapo nebereikia ir jį galima praleisti. Iš agarozės gelio ištrauktas DNR fragmentas sukarpomamas naudojant NdeI ir HindIII, klonuojamas į atitinkamai sukarpytą pET21b+ plazmidę ir transformuojamas į JM109 E.coli kamieną. Įtarpos dydžio analizei pasirenkami ampicilinui atsparūs klonai. Pasirinkti klonai pakartotinai transformuojami į E.coli kamienus BL21(DE3), o pilnos restrikcijos schemos analizė atliekama su jų plazmidžių DNR. Nustatoma patvirtintųjų klonų seka.

5 pavyzdys Sulietos OSM-IFNa5 heterostruktūros klonavimo schema

OSM geno paruošimą suliejimui sudaro PGR būdu atliekama genų amplifikacija, NdeI vietos pridėjimas 5' gale ir TAG stop-kodono pašalinimas iš 3' galo. PGR produkto amplifikacija atliekama naudojant tiesioginį pradžmenį OSM-FOR-NDE ir atvirkštinį pradžmenį OSM-REV-(-STOP). Paskui amplifikuotas ir išgrynintas OSM genas sukarpomamas, naudojant BsaWI restrikcijos endonukleazę, iš geno 3' galo pašalinama 10 bazių porų. BsaWI vieta panaudojama lipniojo galo ligavimui su IFNa5 genu.

IFNa5 geno paruošimą suliejimui sudaro PGR amplifikacija, HindIII vietos pridėjimas geno 3' gale ir 25 bazių porų ilgio OSM geno fragmento galo sujungimas su BsaWI taikiniu. PGR produkto amplifikacija atliekama naudojant tiesioginį pradžmenį IFNa5-FOR-BSA ir atvirkštinį pradžmenį IFNa5-REV-HIND. Paskui amplifikuotas ir išgrynintas IFNa5 genas pridėtojoje OSM sekoje sukarpomamas naudojant BsaWI taikinį.

7 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	T _m
OSM-FOR-NDE	AAACATATGGCGGCTATAGGCAGC	NdeI (CATATG)	66,2°C
OSM-REV-(-STOP)	TCTCCGGCTCCGGTTCGG	BsaWI (ACCGGA)	65,7°C
IFNA5-FOR-BSA	AGAGCCCGAACCGGAGCCGGAG ATGTGATCTGCCGCAGA	BsaWI (ACCGGA)	>75°C
IFNA5-REV-HIND	AATTAAGCTTTTATTCCTTACGAC	HindIII (AAGCTT)	51,3°C

BsaWI sukarpyti produktai ekvimoliniais santykiais liguojami kartu su T4 DNR ligaze. Gautas mišinys gryninamas, iš agarozės gelio iškerpant 1100 bazių porų ilgio fragmentą. Iš agarozės gelio ištrauktas DNR fragmentas sukarpomomas naudojant NdeI ir HindIII, klonuojamas į atitinkamai sukarpytą pET21b+ plazmidę ir transformuojamas į JM109 E.coli kamieną. Atliekama ampicilinui atsparių klonų įtarpos dydžio analizė. Pasirinkti klonai pakartotinai transformuojami į E.coli kamienus BL21(DE3), o pilnos restrikcijos schemos analizė atliekama su jų plazmidžių DNR. Nustatoma patvirtintųjų klonų seka.

6 pavyzdys. IFNA2B-IFNA5/PET21B+/E.COLI BL21(DE3) BIOSINTEZĖ BIOREAKTORIUJE

Visais tirtais atvejais E. coli BL21(DE3) / pET21b+ / IFNa2b-IFNa5 serijinė biosintezė atlikta naudojant 1,4 l darbinio tūrio fermentatorių „Biostat M“, kai pH 6,8–7,0, pO₂ – 30 %, su automatiškai valdomais prisijungus (on-line) kintamaisiais (temperatūra, maišymas, pH, pO₂) ir valdomu neprisijungus (off-line) kintamuoju – optiniu tankiu (santrumpa OD, matuojamas ties bangų ilgiu 600 nm Ependorfo spektrofotometru).

Laštelėms auginti naudotos dvi terpės: M9 ir modifikuota M9m. M9 terpės, skirtos fermentavimui, sudėtis (g/l): mielių ekstraktas – 20,0, amonio chloridas – 5,0, magnio sulfato heptahidratas – 0,5, dinatrio vandenilio fosfatas – 4,7, kalio divandenilio fosfatas – 4,5, gliukozės monohidratas – 22. M9m terpės, skirtos inokuliacijai, sudėtis (g/l) tokia: mielių ekstraktas – 10, amonio chloridas – 1, magnio sulfato heptahidratas

– 0,5, dinatrio vandenilio fosfatas – 6,6, kalio divandenilio fosfatas – 2,7, gliukozės monohidratas – 5. M9m terpės, skirtos fermentavimui, sudėtis (g/l): mielių ekstraktas – 20,0, amonio chloridas – 5,0, magnio sulfato heptahidratas – 0,5, dinatrio vandenilio fosfatas – 7, kalio divandenilio fosfatas – 6,8, gliukozės monohidratas – 15.

Fermentavimo procesų šiose abiejose terpėse palyginimas pateiktas 8 lentelėje ir Fig. 4. Pastebėtina, kad visi valdomi modifikuotos M9m terpės parametrai yra kur kas geresni nei M9 terpės. Pradinė biosintezės eksperimento trukmė buvo 5,5 val., indukciją taikant trečią auginimo valandą.

8 lentelė

Valdomi parametrai	M9 terpė	M9m terpė
Darbinis tūris, l	1.4	1.4
Galutinė IPTG koncentracija, mM	0.5	0.5
Fermentacijos trukmė, h	5.5	5.5
Indukcijos laikas, h	3.0	3.0
Indukcijos OD	1.5	8.9
Galutinis OD	2.9	23.9
Drėgnos biomasės išeiga, g/l	4.6	39.3
Bendras baltymų kiekis, mg/g drėgnos biomasės	86.6	99.6
IFNa2b-IFNa5, % nuo viso baltymų kiekio	66.0	62.5
IFNa2b-IFNa5, mg/g biomasės (apskačiuota pagal bendrą baltymų kiekį)	57.1	62.2
IFNa2b-IFNa5, mg/l ląstelių suspensijos (pagal bendrą baltymų kiekį)	262.8	2445.9

Deja, per 5,5 val. trukusios biosintezės paskutiniąją valandą sumažėjo plazmidės stabilumas, galiniame taške jis siekė tik 60 %. Plazmidžių neturinčių ląstelių kaupimasis yra nepageidautinas, kadangi gryninimo metu padidėja baltymų apkrova. Siekiant išvengti šios problemos, buvo pakeistas biosintezės proceso grafikas: indukcijos taškas perkeltas į antrąją auginimo valandą, auginimui po indukcijos paliekant tik 2 valandas. Analizuojant proceso valdymą gauti tokie optimizuoti biosintezės M9m terpėje rodikliai:

9 lentelė

Valdomi parametrai	Reikšmė
Drėgnos biomasės išeiga, g/l	28,5±0,9

Bendras baltymų kiekis, mg/g drėgnos biomasės	73,4±7,6
IFNa2b-IFNa5, % nuo bendro baltymų kiekio (SDS-PAGE)	65,1±10,2
IFNa2b-IFNa5, mg/g biomasės (apsikačiuota pagal bendrą baltymų kiekį)	47,7±8,5
IFNa2b-IFNa5, mg/l ląstelių suspensijos (pagal bendrą baltymų kiekį)	1364,1±72,8

7 pavyzdys. SULIETŲ IFN ALFA-2B – IFN ALFA-5 BALTYMŲ IŠSKYRIMAS IR GRYNINIMAS

Chromatografinis gryninimas vykdytas tokiomis pakopomis: hidrofobinės sąveikos chromatografija per fenil-Sefarozės kolonėlę, toliau – anijonų ir katijonų mainų chromatografija; tačiau kiekviena šių pakopų buvo atitinkamai koreguota pagal sulietų baltymų elgesį.

Procesui vykdyti kaip pradinė medžiaga imta 10 g biomasės. 10 g biomasės suspendavo buferiniame tirpale, sudarytame iš 89,6 ml 0,1 M Tris-HCl buferio, pH 8,0, 2 mM EDTA ir 25 mM DTT, 400 µl 250 mM PMSF ir 10 ml 0,1 % TritonX-100. Pridedant 6 M HCl, pH reikšmė koreguota iki 7,5. Ląstelės suardytos, 30 min. veikiant ultragarso aparatu Sonics Vibra, impulsais po 1 sekundę (įjungta) ir 2 sekundes (išjungta), 40 % galingumu. Po to tirpieji ir netirpieji baltymai buvo atskirti, centrifuguojant 30 min. +4 °C temperatūroje 12000 aps./min. greičiu. Intarpiniai kūneliai dukart plauti šaltu (+4 °C) I buferiu, turinčiu 1 M NaCl ir 0,1 % polisorbato-80 priedų. Trečiam plovimui naudotas II buferis, turintis 6 M karbamido, ir plovimo procedūra užbaigta III buferiu. Po kiekvieno preliminaraus plovimo ciklo IB buvo suspenduoti 100 ml atitinkamo buferio, santykiu 10 ml buferio intarpinių kūnelių kiekiui, išskirtam iš 1 g biomasės, ir centrifuguoti. Plovimo buferių sudėtis tokia: I buferis – 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,1 % polisorbato-80, pH 7,4; II buferis – 10 mM Tris-HCl, 6 M karbamidas, pH 8,0; III buferis – 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Po preliminaraus plovimo intarpiniai kūneliai buvo suspenduoti 60 ml 25 mM Gly/NaOH buferio, pH 9,6, kurio sudėtyje buvo 6 M guanidino hidroklorido (GdmCl) ir 20 mM DTT. Tirpinama (soliubilizuojama) nuolat maišant 2 val. +4 °C temperatūroje. Paskui intarpinių kūnelių soliubilizatas centrifuguotas 30 min. +4 °C temperatūroje 12000 aps./min. greičiu.

Visais tirtais atvejais persivyniojimas vyko, skiedžiant intarpinių kūnelių tirpalą

iš viso 16 kartų. Tam tikslui 56 ml IB tirpalo išpilama į refoldavimo buferį, nustatytą laiką (40–120 val.) švelniai maišant gautą tirpalą +4 °C temperatūroje. Refoldavimo buferis buvo sudarytas iš 25 mM glicino/NaOH buferio, pH 9,6, turinčio 1,2 M NaCl, 0,5 M L-Arg ir pasirinktą redukuoto/oksiduoto glutationo porą GSH / GSSG santykiu 5,0 mM : 0,25 mM.

Pirmoji chromatografinio gryninimo pakopa – persivyniojusio sulieto baltymo chromatografija per fenil-Sefarozės FF kolonėlę. Šis chromatografijos etapas iš esmės skirtas korektiškai susivyniojusį baltymą atskirti nuo likutinio (0,375 M) GdmCl, kurio buvimas riboja galimybes panaudoti kitą įprastinę rekombinantinių baltymų chromatografinio gryninimo procedūrą. Taigi, po persivyniojimo stadijos sulieto baltymo tirpalas pakraunamas į fenil-Sefarozės FF kolonėlę su 20 mM TrisHCl buferio, pH 8,2, kurio sudėtyje yra 1,5 M NaCl, ir išplaunamas iš kolonėlės, naudojant 10 mM TrisHCl buferį, pH 9,2, į kurį ne pridėta druskų. Toliau išplauto baltymo chromatografija atliekama per anijonitus. Buvo patikrinta Q-Sefarozės FF terpė ir DEAE-Sefarozės FF anijonitas. Trečiai chromatografinio gryninimo pakopai buvo pasirinkta SP-Sefarozės FF kolonėlė, pH 5,5. Iš šios kolonėlės gauto sulieto baltymo porcija buvo perskirta į dvi dalis, iš kurių viena buvo acetatinio buferio sistemoje, o kitoje buferis pakeistas į PBS. Abu baltymo turinčios dalys koncentruotos iki 1 mg/ml, steriliai filtruotos ir išpilstytos alikvotinėmis dalimis stabilumui įvertinti, užšaldant -80 °C temperatūroje ir užšaldymo-atitirpinimo ciklo metu. Abu preparatai pasirodė esą stabilūs.

Masių spektrometru gauti duomenys patvirtino, kad IFN alfa-2b ir IFN alfa-5 partnerių suliejimo polipeptidinė grandinė buvo taisyklinga, su IFN alfa-2b seka N-galuose. Nustatytoji suliejimo molekulinė masė gerai atitiko apskaičiuotą molekulinę masę. Abu suliejimo partneriai atpažino atitinkamus specifinius antikūnus (Fig. 5), kas parodo, kad abu jie yra korektiškai susivynioję. Apibendrinant, šiame pavyzdyje pateikti duomenys įrodo, kad genetinis IFN alfa-2b ir IFN alfa-5 suliejimas duoda naują darinį, kurį galima gaminti išlaikant priimtinos kokybės požymius koncepcijos įrodymo tyrimams.

8 pavyzdys. CHIMERINIO BALTYMO GRYNUMO NUSTATYMAS SE-HPLC BŪDU

Chimeros monomero lygis išgrynintame mėginyje buvo nustatytas pusiau kiekybiniu metodu, naudojant SE-HPLC būdą. Jokių specialių mėginių paruošimo veiksmų nesiimta.

Įleidžiamo mėginio kiekis įvertintas pagal chromatografinės frakcijos sugerties vidurkį. Pagrindinė chimeros smailė nustatyta naudojant MS analizę.

SE-HPLC eksperimentiniai rodikliai:

Judančioji fazė: A – 50 mM natrio fosfato, pH 7,0, 0,4 M natrio chlorido

Kolonėlė: Tosoh TSKgel30 WXL, 7,8 x 300 mm, dalelių dydis – 5 μm

Chromatografijos sistema: Walters HPLC sistema Alliance

Aptikimo bangų ilgis: 280 nm

Srauto greitis: 1 ml/min.

Išgryninto IFNa2b-IFNa5 sulieto baltymo SE-HPLC rezultatai pateikti Fig. 6. Iš šio chromatografinio vaizdo matyti, kad sulieto baltymo monomerų kiekis yra daugiau nei 98 %.

9 pavyzdys. PEPTIDŲ ŽEMĖLAPIAI

25 μl tiriamo tirpalo (1 mg/ml) įpilama į 200 μl mėgintuvėlį su 2,8 μl 1,0 mg/ml tripsino tirpalo. Įpilama 1,6 μl 1,0 M kalio fosfato buferio, pH 8,0, paskui 3,6 μl vandens, ir mėgintuvėlio turinys kruopščiai išmaišomas. 5 sekundes centrifuguojama 6000 aps./min. greičiu, paskui tirpalai 18 valandų inkubuojami 37 °C temperatūroje aparate Thermomixer Comfort. Po inkubavimo 100 μl 6,0 M Gu-HCl tirpalo įpilama į mėgintuvėlį ir pridedama 7 μl 1,0 M DTT tirpalo. Mėgintuvėlį 1 minutei pamerkia į verdantį vandenį, o paskui paruošti mėginiai paliekami aušti iki kambario temperatūros.

10 lentelė

Parametras	Reikšmė (pastabos)	
UV detektorius	Bangų ilgis	214 nm
Temperatūra	Kolonėlė	30 °C
	Mėginio laikymo sąlygos	6 °C
Tirpiklio tvarkymo priemonė	A judančiosios fazės kanalas	A judančioji fazė (dejonizuotas vanduo su 0,1 % TFA)
	B judančiosios fazės kanalas	B judančioji fazė (acetonitrilas su 0,1 % TFA)
	Judančiosios fazės Judančios fazės srauto greitis	1 ml/min

11 lentelė

HPLC sistemos programa

Nr.	Laikas, min.	A, %	B, %	Pastabos
1	0,01	100,0	0,0	Paleidimas
2	8,00	100,0	0,0	Izokratinė
3	68,00	40,0	60,0	Linijinis gradientas
4	72,00	40,0	60,0	Izokratinė
5	75,00	100,0	0,0	Linijinis gradientas
6	90,00	100,0	0,0	Pusiausvirinimas

HPLC kolonėlė: Waters Symmetry 3000 C18 4,6 x 250 mm

Peptidų žemėlapių sudarymo rezultatai pateikti Fig. 8. Iš HPLC chromatogramų akivaizdu, kad naujas sulietų baltymų darinys pasižymi visomis smailėmis, kurios yra atskirų partnerių peptidų žemėlapiuose.

10 pavyzdys. PASIRINKTŲ SULIETŲ IFNa-5 BALTYMŲ BIOLOGINIS AKTYVUMAS

Iš ATCC kultūrų kolekcijos buvo gauti negroidų gimdos kaklelio karcinomos ląstelės Hep2c ir pelių encefalomiokardito virusas (EMCV). Hep2c ląstelės augintos RPMI 1640 terpėje, papildytoje 10 % karščiu inaktyvuoto naujagimių veršelių serumo

ir 1,5 g/l natrio bikarbonato. Ląstelių laikymo tankis – $(5-6) \times 10^5$. EMCV buvo dauginamas pelės fibroblastų L-929 ląstelėse.

Interferono alfa 5 ir jo sulietų baltymų biologinis antivirusinis aktyvumas nustatytas atliekant EMCV citopatinio poveikio (CPE) tyrimą. Virusas titruotas iš sankaupų ant Hep2c ląstelių. Šio būdo principas yra aprašytas Armstrong (1971). Visi viruso skiedimai atlikti RPMI 1640 terpėje, papildytoje 2 % karščiu inaktyvuoto naujagimių veršelių serumo. Hep2c ląstelės pasėtos 96 šulinėlių plokštelėje 1 dieną prieš užkrėtimą (koncentracija $5-6 \times 10^5$ ląstelių/ml); tuo pat metu ląstelės apdorotos (trim egzemplioriais) su 50 μ L mitybos terpės, turinčios įvairių koncentracijų chimerinių IFN α preparatų. Po 20–24 val. inkubavimo 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂, Hep2c buvo užkėstos su dvidešimčia sankaupas sudarančių EMCV vienetų. Kontroliniai šulinėliai apdoroti EMCV ir Hep2c be IFN, tik su Hep2c ir tik su terpe. Po 24 val. inkubavimo kontroliniuose virusų mėginiuose stebint mikroskopu turėtų matytis 90–100 % CPE, ir inkubavimą galima nutraukti. Kartais gali prireikti ilgesnio inkubavimo. Terpė iš kiekvieno šulinėlio ištraukiama, ir ląstelės nudažomos 0,05 % (m/t 20 % etanolyje) kristalinio violetinio tirpalo. Po 30 min. kristalinio violetinio tirpalas dekantuojamas ir šulinėliai atsargiai praplaunami vandeniu, džiovinami ir pridedama eliuavimo tirpalo (50 % etanolio su 0,05 % acto rūgšties). Kristaliniu violetiniu dažytų šulinėlių sugertis nustatoma mikroplokšteline skaitytuvu (μ Quant, BioTek) ties 570 nm.

Įvairių IFN α 5 preparatų biologinis aktyvumas buvo apskaičiuotas pagal tarptautinį interferono alfa-2b (gauto iš žmogaus rDNR) standartą, NIBSC produkto Nr. 95/566, 70000 TV/ampulėje, ir išreikštas tarptautiniais vienetais (TV). Kontrolei (be IFN ir be EMCV) buvo priskirtos 0 % ir 100 % apsaugos reikšmės, atitinkamai. Indeliuose, kur degeneracija buvo 50 % mažesnė, negu kontroliniuose viruso mėginiuose, pripažintas interferono efektas.

Citopatinio poveikio sumažinimo tyrimo rezultatai iš esmės atitiko sigmoidinę dozės–atsako kreivę, kai interferono koncentracija (interferono skiedimo atvirkštinis logaritmas) buvo pavaizduota priklausomai nuo dėmės sugerties. Interferono koncentracija (skiedimo atvirkštinis logaritmas) buvo išreikšta kreive priklausomai nuo dėmės sugerties interferono etaloniniam preparatui, kalibruotam tarptautiniais vienetais, ir interferono tirtiems tirpalams. Naudojant linijinę kreivės dalį, interferono koncentracija mėginyje buvo apskaičiuota palyginus tiriamojo ir etaloninio tirpalų

atsakus. Statistinės programos PLA 2,0 versija naudota lygiagrečiams tyrimams skaičiuojant visų eksperimentinių pavyzdžių biologinį potencialą. Visi skaičiavimai atlikti tyrimų rezultatų, gautų per 2 dienas x iš 2 plokštelių per dieną pagrindu, kur standartinio ir tiriamojo tirpalų titravimas atliktas tris kartus. Rezultatai pateikti lentelėje žemiau. Galima matyti, kad visiems trims sulietiems variantams buvo būdingas toks pat biologinis aktyvumas, kaip ir IFNa5 baltymui.

12 lentelė

Interferono α preparatas	Koncentracija, mg/ml	Antivirusinis bioaktyvumas, $\times 10^8$ TV/mg
IFNa2b	8,11	1,77
IFNa5	8,79	0,72
IFNa5 ir IFNa2b mišinys	8,45	1,24
IFNa2b-IFNa5	1,30	0,07
IFNa5-IFNa5	1,53	0,29
IFNa5-OSM	0,98	0,21

Kartu su sulietų IFNa5 baltymų biologinio aktyvumo išsaugojimu buvo tiriamas sulietų baltymų aktyvumas kaip antivirusinių agentų užkrėstų žiurkių organizme. Šiuose tyrimuose vienas vienetas buvo apibrėžtas kaip interferono kiekis mililitrui, reikalingas virusinės infekcijos citopatiniam poveikiui sumažinti 50 %. Pavyzdžiui, IFNa5 žiurkių kraujo serume, TV/ml, stebėtas 6 val., buvo intervale nuo 208 TV/ml praėjus 0,5 val. po injekcijos iki 61,22 TV/ml praėjus šešioms valandoms. Sulieto IFNa2b-IFNa5 baltymo kiekis buvo intervale nuo 191 TV/ml (0,5 val.) iki 54 TV/ml (6 val.), o IFNa5-IFNa5 homodimeras, stebėtas 2 valandomis ilgiau, iki 8 valandų, demonstravo pastovų 40–46 TV/ml aktyvumą per visą tirtąjį 0,5–8 val. laikotarpį.

Iš šio tyrimo matyti, kad sulieti IFNa5 baltymai pasižymi netgi geresnėmis savybėmis, lyginant su IFNa5 baltymais. Pavyzdžiui, IFNa2b-IFNa5 antivirusinis aktyvumas žiurkių organizme buvo toks pat, nors *in vitro* biologinis aktyvumas buvo gana žemas. IFNa5-IFNa5 parodė ilgai trunkantį antivirusinį aktyvumą žiurkėse.

Pramoninis pritaikomumas

Šiame patente siūloma universali virusinių infekcijų ir vėžinių ligų gydymo platforma – sulieti IFNa5 baltymai. Priklausomai nuo kito kartu dalyvaujančio citokino, šiuos baltymus galima panaudoti gydant platų ligų spektrą, įskaitant virusines infekcijas, kepenų ligas ir vėžį. Pateiktas išradimas apima visumą būdų, tinkamų baltymui klonuoti, kultivuoti, gryninti ir formuluoti taip, kad jį būtų galima panaudoti įvairiuose bandymuose su gyvūnais ir ikiklinikiniuose tyrimuose.

SEKŲ SĄRAŠAI

<110> UAB Biotechnologinės farmacijos centras "BIOTECHPHARMA"
 <120> SULIETI INTEREFERONO-ALFA 5 BALTŲMAI SU KITŲ CITOKINU
 IR JŲ GAMYBOS BŪDAS

<130> 2830
 <160> 24
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
 35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Asp Glu
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu
 100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
 130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ala Asn Leu Gln
 145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 165 170 175

Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser

180 185 190
 Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 195 200 205
 Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
 210 215 220
 His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
 225 230 235 240
 Ser Ala Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu
 245 250 255
 Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly
 260 265 270
 Val Glu Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg
 275 280 285
 Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser
 290 295 300
 Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 325 330

<210> 2
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
 1 5 10 15
 Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
 20 25 30
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 65 70 75 80

LT 6164 B

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser
 165 170 175

Asn Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro
 180 185 190

Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 195 200 205

Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His
 210 215 220

Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
 225 230 235 240

Ala Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
 245 250 255

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val
 260 265 270

Glu Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys
 275 280 285

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 290 295 300

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 325 330

<210> 3

<211> 332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
 35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Asp Glu
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu
 100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
 130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ala Asn Leu Gln
 145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 165 170 175

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
 180 185 190

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 195 200 205

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
 210 215 220

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
 225 230 235 240

LT 6164 B

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
 245 250 255

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
 260 265 270

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
 275 280 285

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 290 295 300

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 325 330

<210> 4

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
 35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
 50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Asp Glu
 65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
 85 90 95

Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu
 100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
 130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ala Asn Leu Gln
 145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu
 165 170 175

Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln
 180 185 190

Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp
 195 200 205

Val Pro Lys Leu Arg Glu His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro
 210 215 220

Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr
 225 230 235 240

Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu
 245 250 255

Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile
 260 265 270

Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu Gly Leu
 275 280 285

Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Thr
 290 295 300

Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro
 305 310 315 320

Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Arg Phe
 325 330 335

Leu His Gly Tyr His Arg Phe Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser
 340 345 350

Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg
 355 360

<210> 5

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu
 20 25 30

Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu
 35 40 45

His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg
 50 55 60
 Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly
 65 70 75 80

Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala
 85 90 95

Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu
 100 105 110

Gln Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys
 115 120 125

Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala
 130 135 140

Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala
 145 150 155 160

Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg
 165 170 175

Phe Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro
 180 185 190

Asn Arg Ser Arg Arg Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn
 195 200 205

Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe
 210 215 220

Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe
 225 230 235 240

Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu
 245 250 255

Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala

260 265 270
 Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln
 275 280 285
 Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu
 290 295 300
 Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr
 305 310 315 320
 Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys
 325 330 335
 Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 340 345 350
 Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 355 360

<210> 6
 <211> 1002
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinė koduojanti seka
 <400> 6

atgtgtgatc tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca 60
 cagatgggtc gtatctctcc ttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttcct 120
 caggaggagt ttgatggcaa ccagtccag aaggctcaag ccatctctgt cctccatgag 180
 atgatccagc agacctcaa tctctcagc acaaaggact catctgctac ttgggatgag 240
 acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt 300
 atgatgcagg aggttggagt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tctcctgact 360
 gtgagaaaat acttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
 gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct cttatcagc aaactgcaa 480
 gaacgtttac gtcgtaagga atgtgatctg ccgcagaccc actccctgtc taaccgtcgt 540
 actctgatga tcatggcaca gatgggtcgt atctctcctt tctcctgcct gaaggacaga 600
 catgactttg gatttctca ggaggagttt gatggcaacc agttccagaa ggctcaagcc 660
 atctctgtcc tccatgagat gatccagcag acctcaatc tcttcagcac aaaggactca 720
 tctgctactt gggatgagac acttctagac aaattctaca ctgaacttta ccagcagctg 780
 aatgacctgg aagcctgtat gatgcaggag gttggagtgg aagacactcc tctgatgaat 840
 gtggactcta tctgactgt gagaaaatac ttcaaagaa tcactctcta tctgacagag 900
 aagaaataca gcccttgtgc atgggaggtt gtcagagcag aaatcatgag atccttctct 960
 ttatcagcaa acttgcaaga acgtttacgt cgtaaggaat aa 1002

<210> 7
 <211> 999

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

<223> Sintetinė koduojanti seka

<400> 7

atgtgtgac tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca	60
cagatgggtc gtatctctcc ttctctctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttct	120
caggaggagt ttgatggcaa ccagttccag aaggctcaag ccactctgt cctccatgag	180
atgatccagc agacctcaa tctcttcagc acaaaggact catctgtac ttgggatgag	240
acacttctag acaaatctca cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt	300
atgatgcagg aggttgaggt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatctgact	360
gtgagaaaat acttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagccctgt	420
gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct ctttatcagc aaacttgcaa	480
gaacgtttac gtcgtaagga atgtgatctg ccgcagactc actctctggg ttctcgtct	540
actctgatgc tgctggctca gatgcgtct atctctctt tctctgcct gaaagaccgt	600
catgacttcg gttcccgca ggaagagtc ggtaaccagt tccagaaagc tgaaactatc	660
cctgttctgc atgaaatgat ccagcaaacc tcaacctgt tctctactaa agactctct	720
gctgctggg acgaaaccct gctggacaaa ttctacactg aactgtacca gcaactcaac	780
gacctcgagg ctgtgttat tcagggcggt ggtgttaccg aaactccgct gatgaaagag	840
gatagcatcc tggctgttcg caagtattc cagcgtatca ctcttacct gaaggaaaag	900
aagtatagcc cgtgtgctg ggaagtgtt cgtgctgaga tcatgcgttc ctctccctg	960
tctactaacc tgcaggaatc tctgcgttct aaggaatag	999

<210> 8

<211> 999

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

<223> Sintetinė koduojanti seka

<400> 8

atgtgtgac tgccgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct	60
cagatgcgtc gtatctctct ttctcttgc ctgaaagacc gtcatgactt cggtttccc	120
caggaagagt tccgtaacca gtccagaaa gctgaaacta tccctgttct gcatgaaatg	180
atccagcaaa tctcaacct gttcttact aaagactctt ctgctgctt ggacgaaacc	240
ctgctggaca aattctacac tgaactgtac cagcaactca acgacctcga ggctgtgtt	300
attcagggcg ttggtgttac cgaaactccg ctgatgaaag aggatagcat cctggctgtt	360
cgcaagtatt tccagcgtat cactcttac ctgaaggaaa agaagtatag cccgtgtgct	420
tgggaagtgt tctgtctga gatcatgctt tcttctccc tgtctactaa cctgcaggaa	480
tctctgcgtt ctaaggaatg tgatctgccg cagaccact cctgtctaa ccgtcttact	540
ctgatgatca tggcacagat ggtcgtatc tctcttct cctgcctgaa ggacagacat	600
gactttgat ttctcagga ggagttgat ggcaaccagt tccagaaggc tcaagccatc	660
tctgtctcc atgagatgat ccagcagacc tcaatctct tcagcacaaa ggactcatct	720
gctactggg atgagacact ttagacaaa ttctacactg aactttacca gcagctgaat	780
gacctggaag cctgtatgat gcaggaggtt ggagtggaag acactcctct gatgaatgtg	840
gactctatcc tgactgtgag aaaatactt caaagaatca ctctctatct gacagagaag	900
aaatacagcc ctgtgcatg ggaggtgtc agagcagaaa tcatgagatc ctctcttta	960
tcagcaaact tgcaagaacg ttacgtctg aaggaataa	999

<210> 9
 <211> 1092
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinė koduojanti seka
 <400> 9

atgtgtgatc tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca 60
 cagatgggtc gtatctctcc ttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttct 120
 caggaggagt ttgatggcaa ccagttccag aaggctcaag ccattctgt cctccatgag 180
 atgatccagc agacctcaa tctctcagc acaaaggact catctgctac ttgggatgag 240
 acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt 300
 atgatgcagg aggttgaggt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatcctgact 360
 gtgagaaaat actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
 gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct cttatcagc aaacttgcaa 480
 gaacgtttac gtcgtaagga agcggctata ggcagctgct cgaaagagta ccgcgtgctc 540
 cttggccagc tccagaagca gacagatctc atgcaggaca ccagcagact cctggacccc 600
 tatatacgta tccaaggcct ggatgttctt aaactgagag agcactgcag ggagcgcccc 660
 ggggccttcc ccagtgagga gaccctgagg gggctgggca ggcggggctt cctgcagacc 720
 ctcaatgccca cactgggctg cgtcctgcac agactggccg acttagagca ggcctctccc 780
 aaggccagc atttgagag gtctgggctg aacatcgagg acttgagaa gctgcagatg 840
 gcgaggccga acatcctcgg gctcaggaac aacatctact gcatggccca gctgctggac 900
 aactcagaca cggctgagcc cacgaaggct ggccgggggg cctctcagcc gccaccccc 960
 accctgcct cggatgctt tcagcgcaag ctggagggtc gcaggttct gcatggctac 1020
 catcgcttca tgcactcagt ggggcgggtc ttcagcaagt ggggggagag cccgaaccgg 1080
 agccggagat aa 1092

<210> 10
 <211> 1092
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinė koduojanti seka
 <400> 10

atggcggcta taggcagctg ctcgaaagag taccgctgc tccttgcca gctccagaag 60
 cagacagatc tcatgcagga caccagcaga ctctggacc cctatatacg tatccaaggc 120
 ctggatgttc ctaaactgag agagcactgc agggagcgcc ccggggcctt cccagtgag

LT 6164 B

180
 gagaccctga gggggctggg caggcggggc ttctgcaga ccctcaatgc cacactgggc
 240
 tgcgtcctgc acagactggc cgacttagag cagcgccctcc ccaaggccca ggatttggag
 300
 aggtctgggc tgaacatcga ggacttggag aagctgcaga tggcgaggcc gaacatcctc
 360
 gggctcagga acaacatcta ctgcatggcc cagctgctgg acaactcaga cacggctgag
 420
 cccacgaagg ctggccgggg ggcctctcag ccgcccaccc ccacccctgc ctcggatgct
 480
 ttccagcgca agctggaggg ctgcaggttc ctgcatggct accatcgctt catgcactca 540
 gtggggcggg tcttcagcaa gtggggggag agcccgaacc ggagccggag atgtgatctg
 600
 ccgcagaccc actccctgtc taaccgtcgt actctgatga tcatggcaca gatgggtcgt 660
 atctctcctt tctctgcct gaaggacaga catgacttg gatttctca ggaggagtt 720
 gatggcaacc agttccagaa ggctcaagcc atctctgtcc tccatgagat gatccagcag 780
 acctcaatc tcttcagcac aaaggactca tctgctactt gggatgagac acttctagac 840
 aaattctaca ctgaacttta ccagcagctg aatgacctgg aagcctgtat gatgcaggag 900
 gttggagtgg aagacactcc tctgatgaat gtggactcta tctgactgt gagaaaatac 960
 ttcaaagaa tcactctcta tctgacagag aagaaataca gcccttgtgc atgggaggtt 1020
 gtcagagcag aaatcatgag atccttctct ttatcagcaa acttgcaaga acgtttacgt 1080
 cgtaaggaat aa 1092

<210> 11
 <211> 27
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 11

attatcatat gtgtgatctg ccgcaga

27

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 12

ttccttacga cgtaaacgtt cttgc

25

<210> 13
 <211> 41
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka

<220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 13
 ttcttacga cgtaaacgtt cttgctgtga tctgccgcag a 41

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 14
 gacgtaaacg ttcttgctaa aagctttaa 30

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 15
 ttaacatatg tgtgatctgc cgca 24

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 16
 ttcttagaa cgagagatt cctgcaggtt 30

<210> 17
 <211> 48
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 17
 ttctgcagg aatctctgcg ttctaaggaa tgtgatctgc cgagacc 48

<210> 18
 <211> 27
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 18

ttaaagcttc tatctccggc tccggtt

27

<210> 19
 <211> 38
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 19

ttaacgttta cgtcgtaagg aagcggctat aggcagct

38

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 20

aaacatatgg cggctatagg cagc

24

<210> 21
 <211> 18
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo
 <400> 21

tctccggctc cggttcgg

18

<210> 22
 <211> 39
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 <220>
 <223> Sintetinis pradmuo

<400> 22

agagcccgaa ccggagccgg agatgtgac tgccgcaga

39

<210> 23

<211> 28

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

<223> Sintetinis pradmuo

<400> 23

tacgtcgtaa aggaatgtga tcgccgca

28

<210> 24

<211> 23

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

<223> Sintetinis pradmuo

<400> 24

aaaaagcttc tattccttag aac

23

Išradimo apibrėžtis

1. Sūlietas baltymas, apimantis interferoną alfa 5 (IFNa5), kurio bendroji formulė (I) arba (II)



(I)



(II)

kur suliejimo partneris X yra kitas interferonas alfa arba citokinas.

2. Sūlietas baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad IFNa5 yra žmogaus rekombinantinis interferonas-alfa 5, ir X yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš IFNa5, INFa2b ir onkostatino.

3. Sūlietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad IFNa5 yra homodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 1 arba seka, kurios identiškumas bent 95 %.

4. Sūlietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra IFNa2b-IFNa5 heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 2 arba seka, kurios identiškumas bent 95 %.

5. Sūlietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra IFNa5-IFNa2b heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 3 arba seka, kurios identiškumas bent 95 %.

6. Sūlietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra IFNa5-OSM heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 4 arba seka, kurios identiškumas bent 95 %.

7. Sūlietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis

yra OSM-IFNa5 heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 5 arba seka, kurios identiškumas bent 95 %.

8. Sulietas baltymas pagal bet kurį iš 1-7 punktų, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad jis pasižymi būdingu IFNa5 biologiniu aktyvumu kartu su prailgintu pasišalinimo iš organizmo laiku.

9. DNR fragmentas, koduojantis sulietą baltymą pagal bet kurį iš 1-8 punktų, kur koduojanti seka yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 arba sekos, koduojančios tą patį baltymą.

10. Vektorius, apimantis DNR fragmentą pagal 9 punktą, koduojantį sulietą baltymą pagal 1-8 punktą, kur minėtas vektorius yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš pET21b+, pET28a+, pUC57/T ir pT7, geriau pET21b+.

11. Sulieto baltymo pagal 1-8 punktus gamybos būdas, kuriame:

a) paruošia ląstelę šeimininkę, galinčią produkuoti minėtą IFNa5 sulietą baltymą;

b) kultivuoja ląsteles šeimininkes sąlygomis, efektyviomis ekspresuoti minėtą IFNa5 sulietą baltymą tinkamoje fermentacijos terpėje; ir

c) išskiria ir grynina ekspresuotą IFNa5 sulietą baltymą,

b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad

- minėtas išskyrimas yra išskyrimas iš b) stadijoje gauto mišinio, apimančio tikslinį sulietą baltymą tarpinių kūnelių pavidalu, vykdant jų tirpinimą ir po to – oksidacinę renatūraciją; ir

- minėtas gryninimas yra trijų pakopų chromatografinis gryninimas, kuriame:

minėtą mišinį, apimantį renatūruotą IFNa5 sulietą baltymą, apdoroja hidrofobinės sąveikos chromatografija;

po to gautą prieš tai einančioje pakopoje mišinį veikia anijonų mainų chromatografija; ir toliau gautą ankstesnėje pakopoje tirpalą grynina katijonų mainų chromatografija.

12. Būdas pagal 11 punktą, kur ląstelė šeimininkė yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš *E.coli*, *S.cerevisiae*, *K.lactis*, optimaliai *E.coli*, geriau proteazių neturinčio *E.coli* kamieno, tokio kaip *E.coli* BL21 ir Rosetta gami-2, geriausiai - *E.coli* BL21, ir kur tinkama fermentacijai terpė yra bet kuri sudėtinė terpė, apimanti mielių ekstraktą kaip azoto šaltinį ir gliukozę kaip anglies šaltinį, optimaliai M9m terpė.

13. Būdas pagal 11-12 punktus, kur efektyvios ekspresuoti minėtą IFNa5 sulietą baltymą sąlygos apima indukciją, optimaliai su izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidu (IPTG), optimaliai esant 0,1mM – 1mM IPTG koncentracijai, geriausiai 0,5 mM, ir indukcija nebūtinai yra perkelta į ankstyvą auginimo stadiją.

14. Būdas pagal 11-13 punktus, kur minėtą tirpinimą atlieka chaotropiniame ir denatūruojančiame tirpale, kuris apima 6-8 M karbamidą arba 4-6 M guanidino hidrochloridą, optimaliai 6 M guanidino hidrochloridą, nebūtinai turintį 20 mM DTT.

15. Būdas pagal 11-14 punktus, kur minėtą oksidacinę renatūraciją vykdo glicino/NaOH buferyje pH intervale 7,0 - 9,6 ir esant redukuotojo/oksiduotojo glutationo poros GSH/GSSG santykiui 5-20:1 su buferinę talpą turinčiais priedais, pasirinktais iš grupės, susidedančios iš natrio chlorido, natrio sulfato ir amonio sulfato.

16. Būdas pagal 11-15 punktus, kur minėtame 3 pakopų chromatografinio gryninimo hidrofobinės sąveikos chromatografijos sorbentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš butil-Sefarozės, oktil-Sefarozės, fenil-Sefarozės, optimaliai yra fenil-Sefarozė, pH esant intervale 8,2-9,2; ir

anijonų mainų chromatografijos sorbentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš ANX -Sefarozės, Q-Sefarozės, DEAE-Sefarozės, QAE-Sefarozės, optimaliai Q-Sefarozės arba DEAE-Sefarozės, pH esant intervale 8,6-9,0; ir

katijonų mainų chromatografijos sorbentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš S-Sefarozės, SP-Sefarozės ir CM-Sefarozės, optimaliai SP-Sefarozės arba CM-Sefarozės, pH esant intervale 5,2-5,6.

17. Sulietas baltymas pagal 1-8 punktus, gautas būdu pagal 11-16 punktus.

18. Preparatas, apimantis sulietą baltymą pagal 17 punktą stabilaus tirpalo formoje.

19. Sulietas baltymas pagal 17 punktą arba preparatas pagal 18 punktą, skirti naudoti terapijoje.

20. Farmacinė kompozicija, apimanti sulieto baltymo pagal 1-8 punktus arba preparato pagal 18 punktą terapiškai veiksmingą kiekį, ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį, ekscipientą ir/arba pagalbines medžiagas.

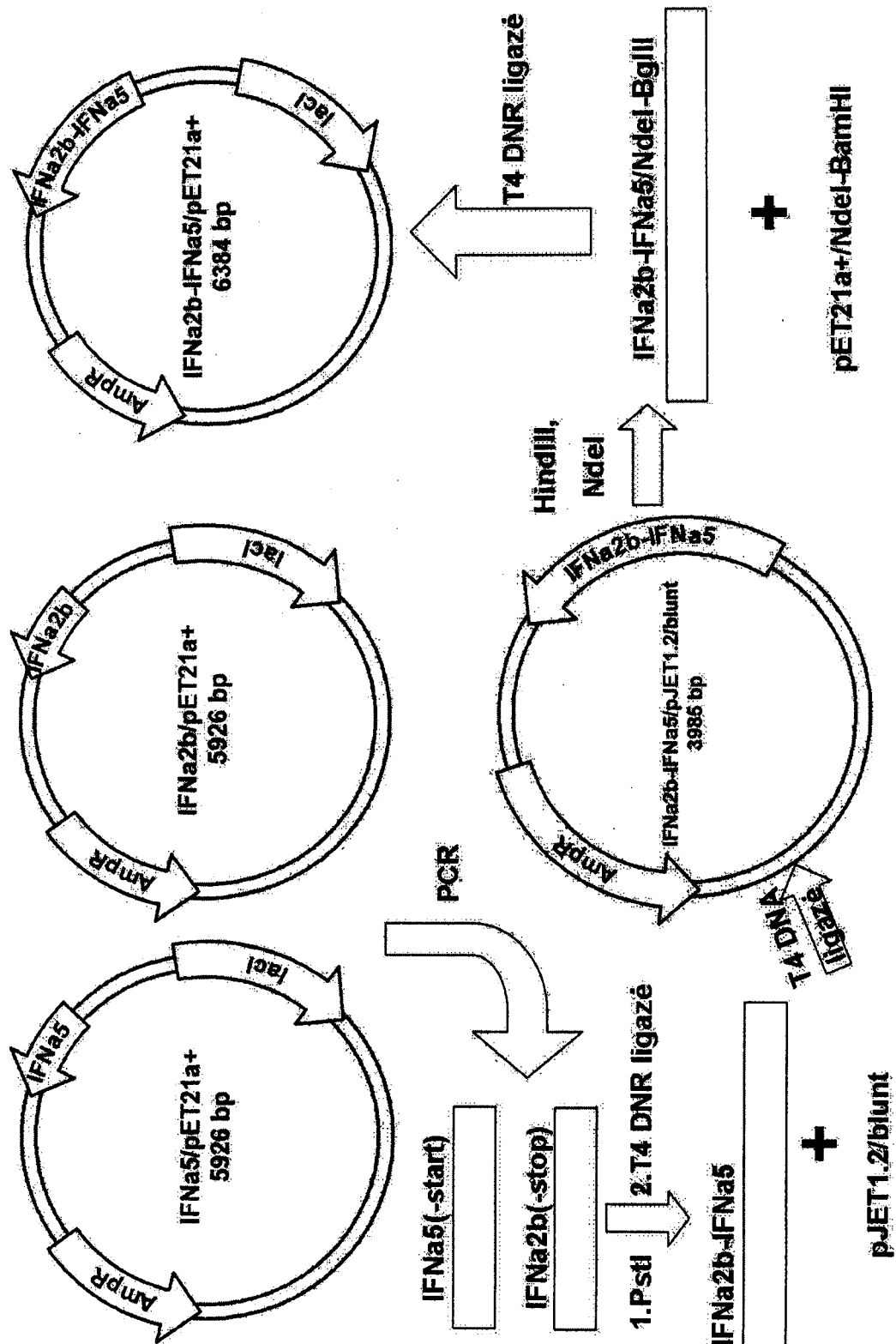
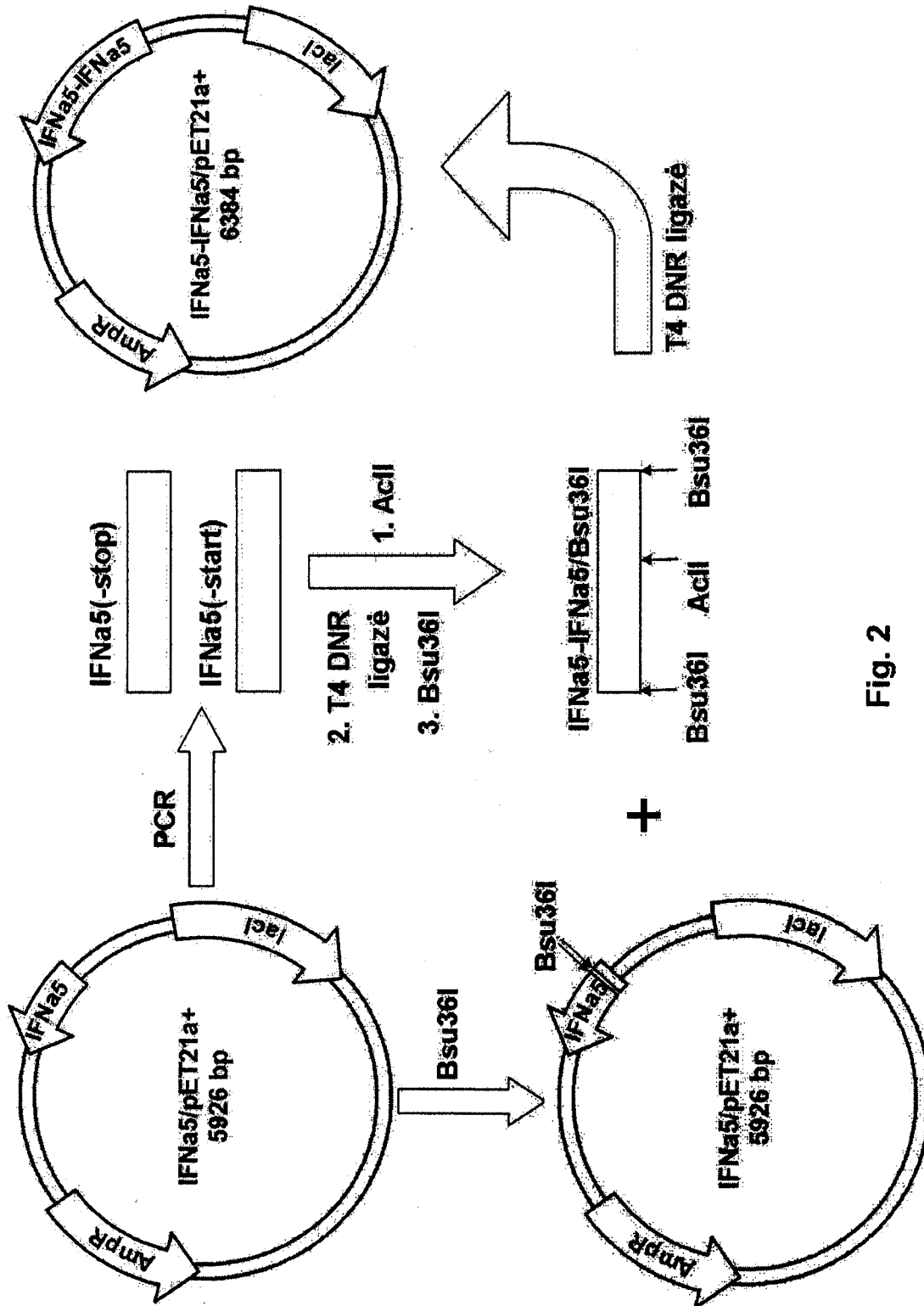


Fig. 1



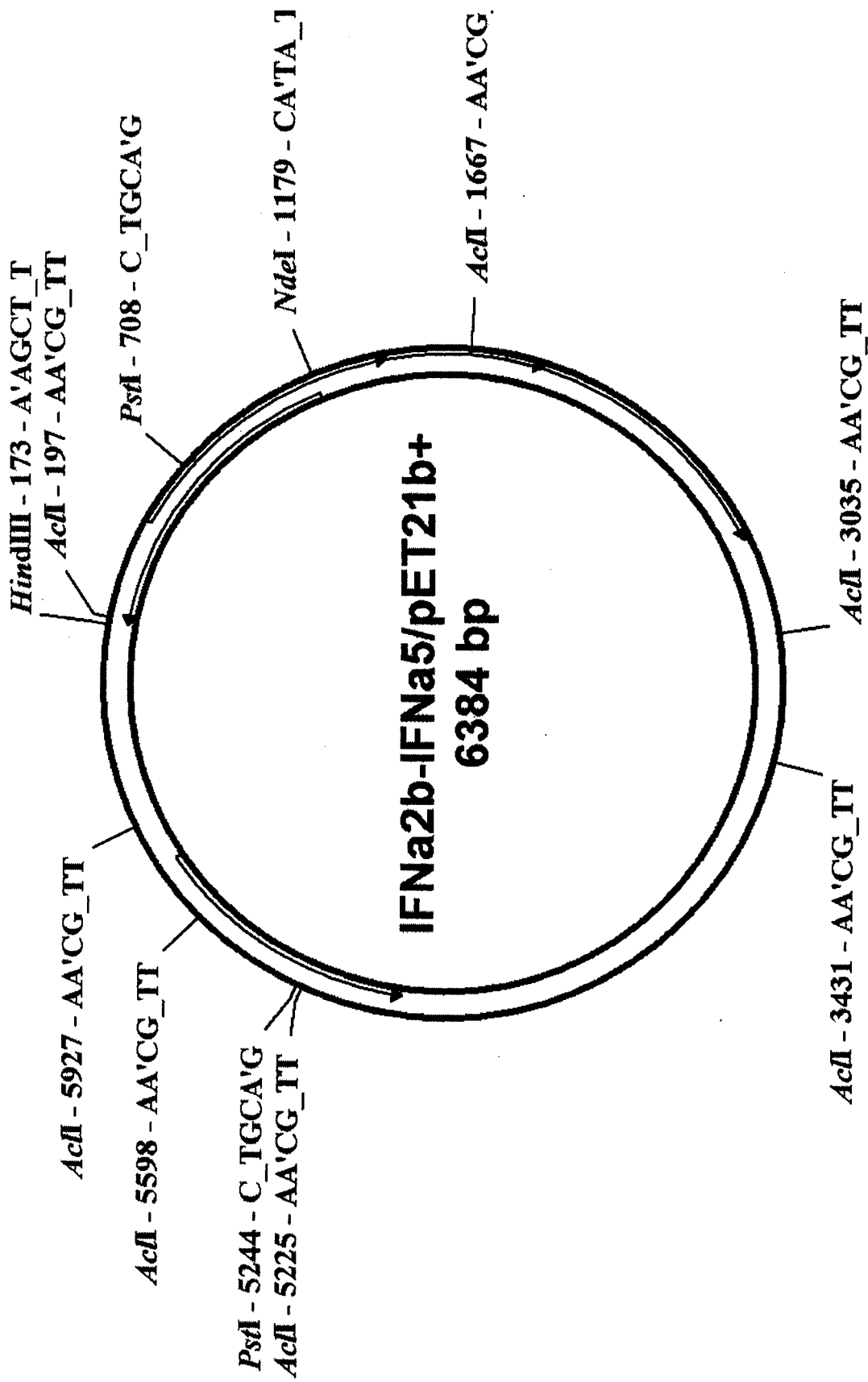


Fig. 3

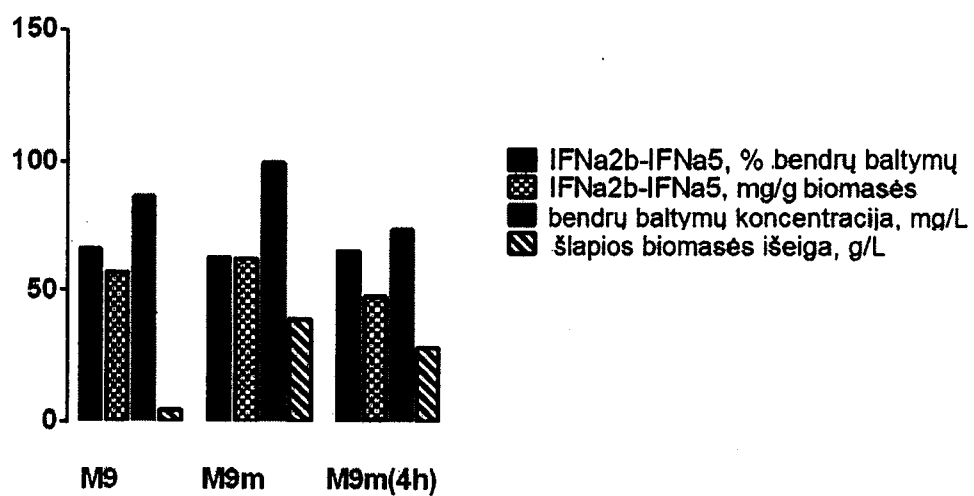
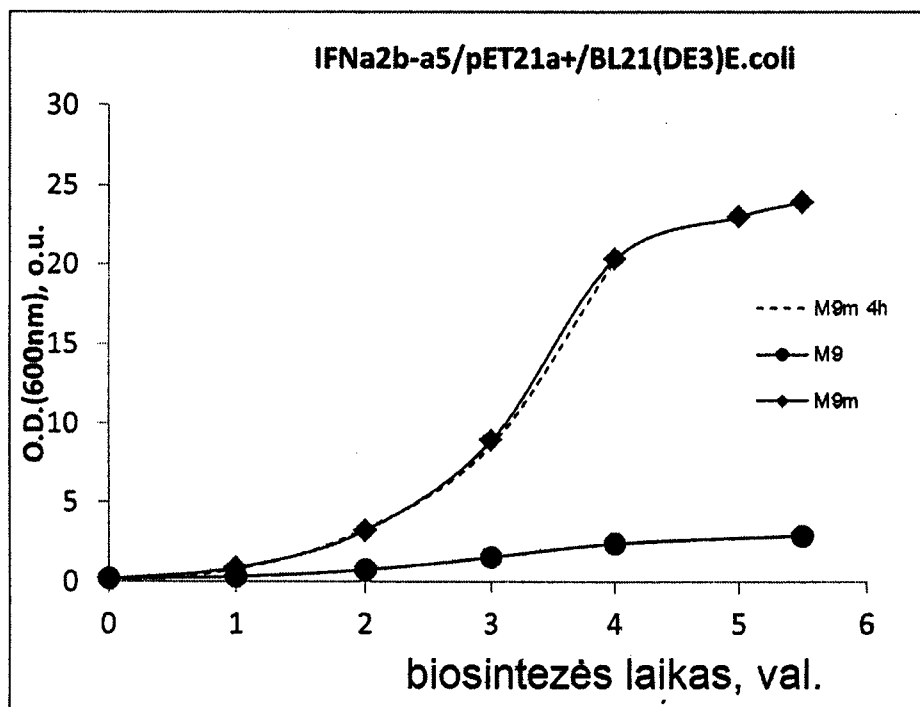


Fig. 4

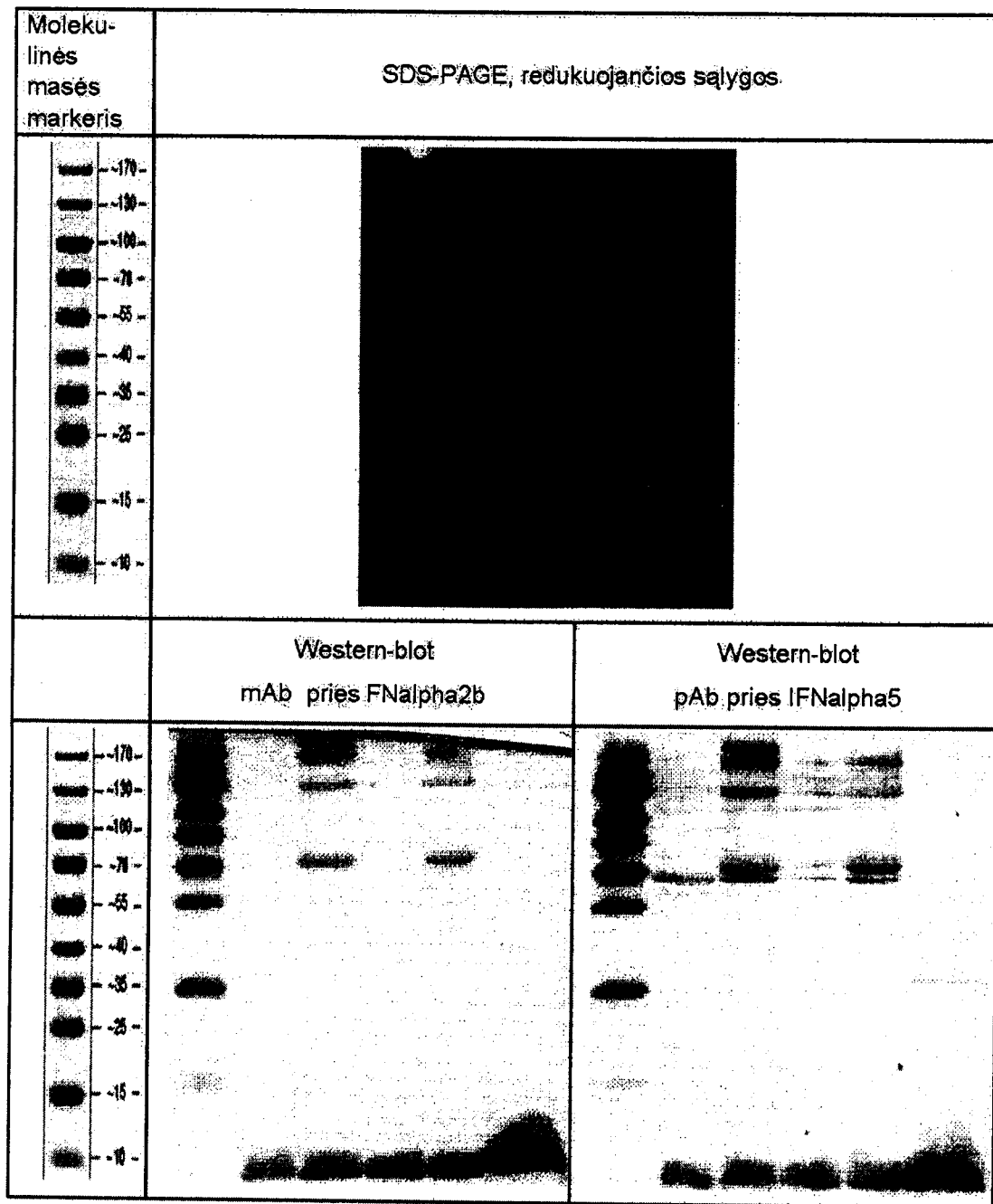


Fig. 5

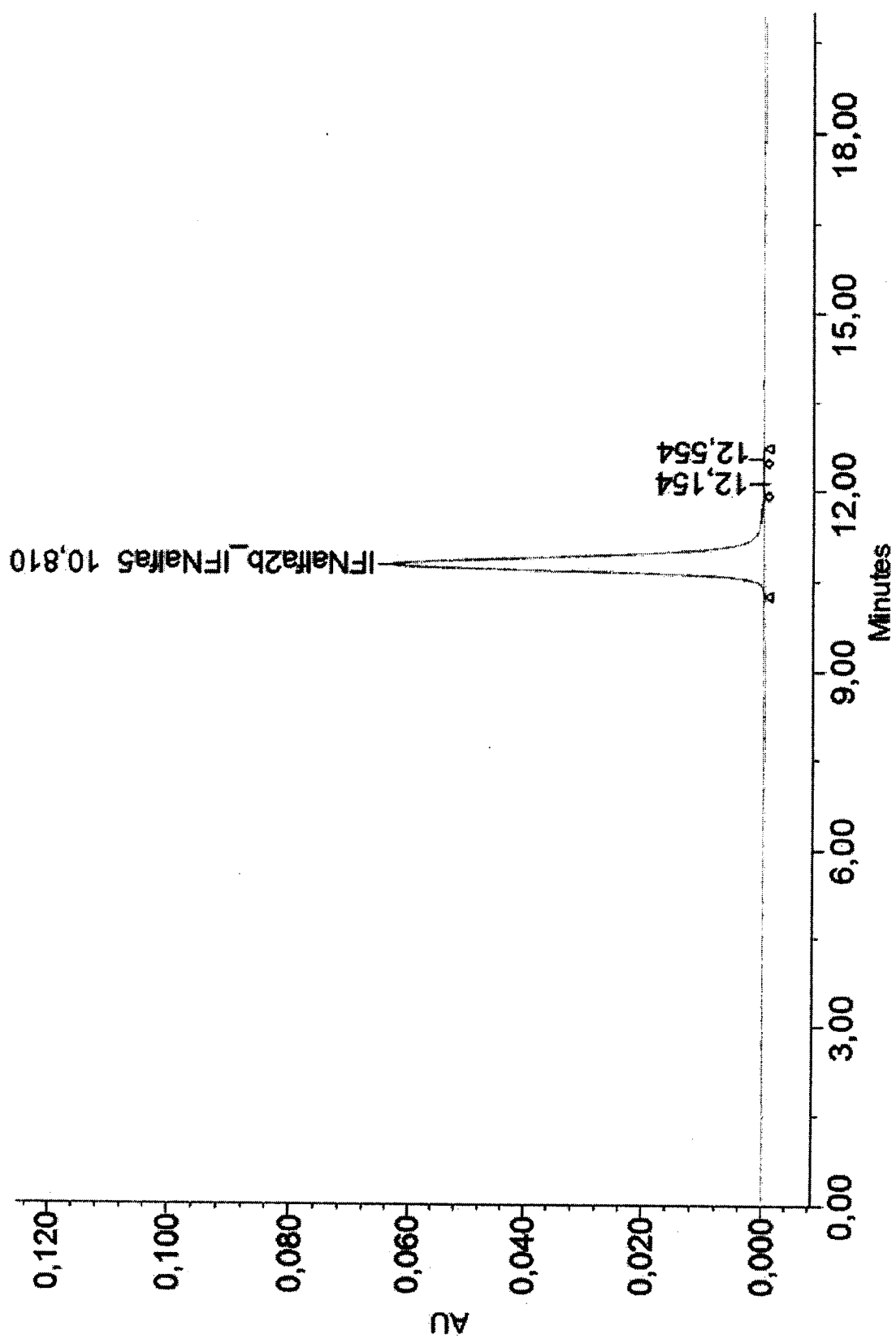
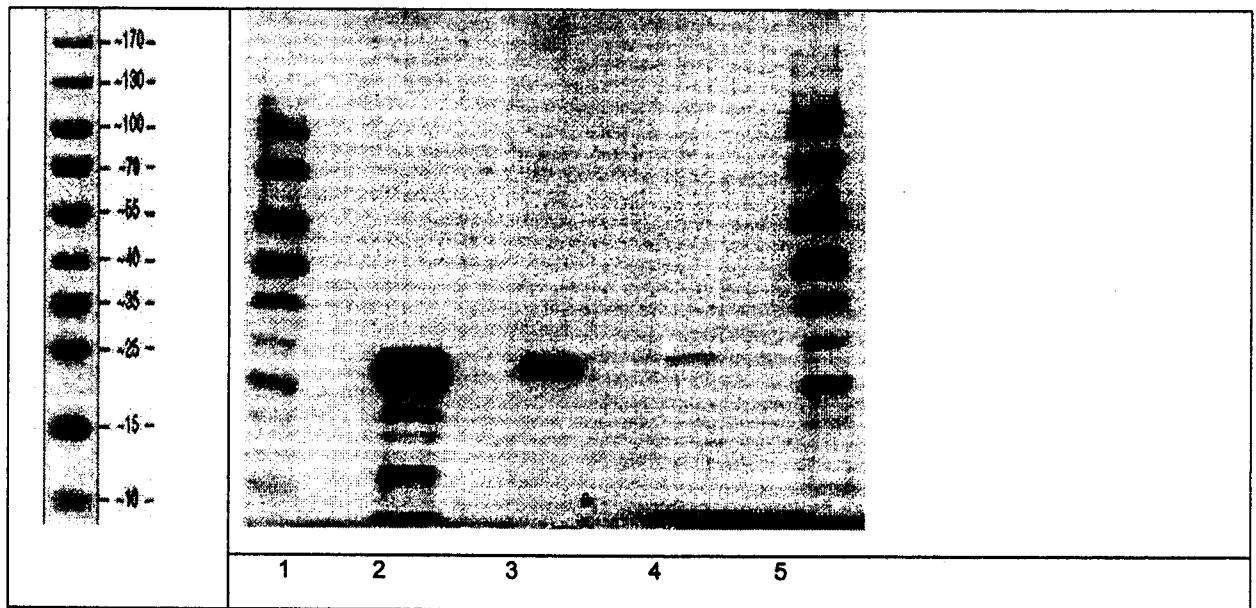


Fig. 6

**Fig. 7**

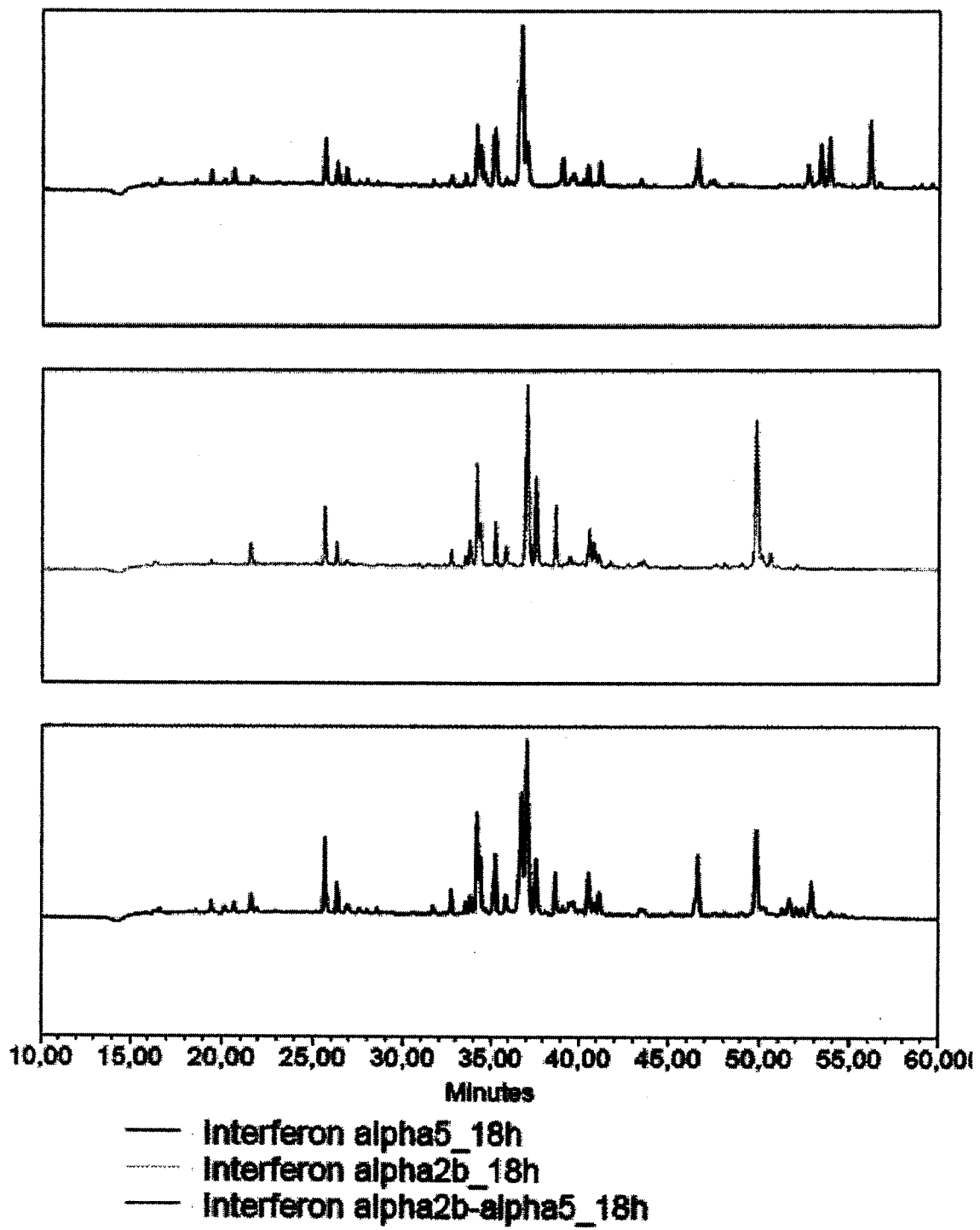


Fig. 8