

(19)



(10) **LT 2013 118 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2013 118**

(51) Int. Cl. (2015.01): **C07K 19/00**
C07K 14/00
A61K 38/00

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

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

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

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

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

(72) Išradėjas:

**Vladas Algirdas BUMELIS, LT
Saulė SŪDŽIUVIENĖ, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

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

(54) Pavadinimas:

Sulieti interferono-alfa5 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 intereferono 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.

SULIETI INTERFERONO ALFA 5 BALTYMAI SU KITU CITOKINU IR JŲ GAMYBOS BŪDAS

išradimo sritis

- 5 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 kitoku interferonu alfa (pageidautina žmogaus interferonu alfa-2b) arba kitoku citokinu (pageidautina žmogaus natyviu subrendusiu onkostatino M baltymu). Sulieto chimerinio konstrukto N-galo arba C-
- 10 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
- 15 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.

20

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
- 25 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.
- 30 Interferonai, pasižymėdami antivirusiniu, priešnavikiniu ir imunomoduliuojančiu aktyvumu, kartu veikia ląstelių augimą ir diferenciaciją su kryžminių 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
- 35 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., Uzė 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 ženkliu pristatymo sistemos aktyvumo praradimu. Stambios PEG grupės didina hidrodinaminę 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.

10 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
15 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
20 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
25 virusus, pvz., Artimųjų Rytų respiratorinio sindromo koronavirusą, arba tokių odos sutrikimų atvejais, kaip ŽPV infekcijų sukeltami 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
30 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
- 5 proceso, skirto 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
- 10 išsireiškimų reikšmės.

- Terminu „interferonas alfa 5“ (arba IFNa5) čia ir toliau vadinamas baltymas, gaminamas leukocituose, kuris aktyviausiai daugiausiai yra susijęs su įgimtojo imuniniu atsaku į virusines infekcijas ir kuris gali prisijungti prie specifinio ląstelės paviršiaus receptoriaus komplekso, žinomo kaip IFNa receptoriaus (IFNAR). IFNa5 apima baltymus, kurių (I)
- 15 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 įgimtojo imuniniu atsaku į plačią virusinių
- 20 infekcijų grupę, pvz., hepatito B ir C. Rekombinantinį IFNa2b 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.

- 25 Terminu „onkostatinas M“ (OSM) vadinamas baltymas, kurį gamina aktyvintieji T limfocitai, monocitai, mikroglijos. Pagal savo struktūrą ir funkcijas jis priskiriamas hematopoetinių ir neutrofinių citokinų, žinomų kaip interleukinai 6 (IL6) tipo citokinų šeimai, pošeimiui. Žmogaus OSM signalo perdavimas sąlygotas jo prisijungimu prie dviejų receptorių kompleksų: I tipo OSM receptoriaus komplekso (LIF receptoriaus), susidedančio iš
- 30 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 IFNa5 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 IFNa5 aminorūgščių sekai.

„Iš esmės identiška aminorūgščių seka“ reiškia, kad sekos yra identiškos arba skiriasi vienos ar daugiau (iki 5 %) konservatyvių aminorūgščių mutacijomis arba pakeitimais (t. y. delecijomis, intarpais ar pakaitais), kurie nesukelia neigiamų funkcinių skirtumų tarp rekombinantinio baltymo ir natyvaus žmogaus IFNa5, IFNa2b arba OSM. Sekos procentinį identišumą galima nustatyti naudojant programą BLAST („blast2seq“, numatytieji parametrai) [Tatutsova and Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247–250 (1990)].

Čia vartojamu terminu „mikroorganizmas, produkuojantis IFNa5 sulietą baltymą“ vadinamas mikroorganizmas, kuris buvo genetiškai modifikuotas taip, kad gamintų baltymą, pasižymintį su žmogaus IFNa5 siejamu biologiniu aktyvumu. Atitinkamai, terminu „E. coli ląstelė šeimininkė, produkuojanti IFNa5 sulietą baltymą“ vadinama E. coli ląstelė šeimininkė, kuri buvo genetiškai modifikuota taip, kad gamintų baltymą, pasižymintį su IFNa5 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 tikslinius 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, stipriklus 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.

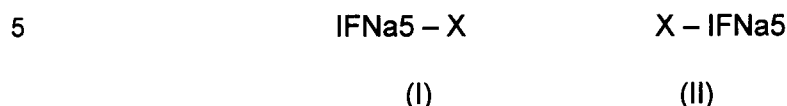
Terminas „ląstelė šeimininkė“ šio išradimo kontekste apima bet kurią ląstelę, turinčią arba nukleotidų seką, arba raiškos vektorių, aprašytus aukščiau, ir kuri yra naudojama rekombinantiniu būdu gauti tikslinį sulietą baltymą, pasižymintį specifinėmis savybėmis, kurios nurodytos čia arba šio išradimo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



kur suliejimo partneris X yra kitas interferonas alfa arba citokinas.

- 10 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
- 15 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 %;
- 20 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
- 25 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
- 30 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:

- 35 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:

- 5 - 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 apdorojimas, kuriame:
 - minėtą mišinį, apimantį renatūruotą IFNa5 sulietą baltymą, apdoroja hidrofobinės sąveikos chromatografiją;
 - 10 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
- 15 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
- 20 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 ditiotreitolio
- 25 DTT.

- Oksidacinę renatūraciją pagal optimalų siūlomo išradimo įgyvendinimo variantą vykdo glicino/NaOH buferyje 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.

30

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.

- 5 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
10 ir/arba pagalbines medžiagas.

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

Trumpas brėžinių aprašymas

- 15 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.
- 20 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
25 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 %
30 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.
- 10 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 nenusipėjimo toksiškumo, įtakos susivyniojimo bei proteolizės procesams ir dėl biopanašumo aspektų.
- 15 Konkrečiais išradimo įgyvendinimo atvejais tinkami yra 1 lentelėje žemiau išvardyti sulieti IFNa5 baltymai.

1 lentelė

Sekos Nr.	ID	Sulietas baltymas	Molekulinė masė	Aminorūgščių seka
1		IFNa5-IFNa5	39161,7	MCDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRISPFSC KDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMI QQTfnlfSTKDSSATWDETLLDKFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVRKY FQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL ANLQERLRRKECDLPQTHSLSNRRTLMIMAQ MGRISPFSCDKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKA QAISVLHEMIQQTfnlfSTKDSSATWDETLLD KFYTELYQQNLNDLEACMMQEVGVEDTPLMN VDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSANLQERLRRKE
2		IFNa2b-IFNa5	38906,5	MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRLSFLSCL KDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQNL DLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQ ESLRSKECDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRIS PFSCDKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAIS VLHEMIQQTfnlfSTKDSSATWDETLLDKFYT ELYQQNLNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSIL TVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSANLQERLRRKE
3		IFNa5-IFNa2b	38906,5	MCDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRISPFSC KDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMI

			QQTfNLFSTKDSSATWDETLDDKFYtELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVRKY FQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL ANLQERLRRKECDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ MRRISLFSClKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAE TIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKF YtELYQQlNDLEACVIQGVGVtETPLMKEDSI LAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIM RSFSLSTNLQESLRSKE
4	IFNa5-OSM	41788,7	MCDLPQTHSLSNRRTLMIAMQGRISPFSCl KDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAIsvLHEMI QQTfNLFSTKDSSATWDETLDDKFYtELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVRKY FQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL ANLQERLRRKEAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQ TDLMQDTSRLDPYIRIQGLDVPKLREHCRER PGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLH RLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMAR PNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGA SQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMH SVGRVFSKWGESPNRSRR
5	OSM-IFNa5	41788,7	MAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRL LDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETL RGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLP KAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNI YCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPA SDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHsvGRVFSK WGESPNSRRCDLPQTHSLSNRRTLMIAMQ MGRISPFSClKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKA QAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWDETLDD KFYtELYQQlNDLEACMMQEVGVEDTPLMN VDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSANLQERLRRKE

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

5 koduojančias sekas, nurodytas žemiau 2 lentelėje

2 lentelė

Sekos ID Nr.	Sulietas baltymas	Koduojanti seka			
6	IFNa5-IFNa5	ATGTGTG GTCGTACTCT TCCTTTCTCC CCTCAGGAGG AAGCCATCTC CAATCTCTTC GAGACACTTC	ATCTGCCGCA GATGATCATG TGCCTGAAGG AGTTTGATGG TGTCCTCCAT AGCACAAAGG TAGACAAATT	GACCCACTCC GCACAGATGG ACAGACATGA CAACCAGTTC GAGATGATCC ACTCATCTGC CTACACTGAA	CTGTCTAACC GTCGTATCTC CTTTGGATT CAGAAGGCTC AGCAGACCTT TACTTGGGAT CTTTACCAGC

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

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

		GATGATCATG	GCACAGATGG	GTCGTATCTC	TCCTTTCTCC
		TGCCTGAAGG	ACAGACATGA	CTTTGGATTT	CCTCAGGAGG
		AGTTTGATGG	CAACCAGTTC	CAGAAGGCTC	AAGCCATCTC
		TGTCCTCCAT	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	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 transfekutas 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 stabiliams disulfidiniais 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.

25

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.

5

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
 10 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
 15 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
 20 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;
 - 25 - 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
 30 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:

- 5 - 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;
- 10 - 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

- 15 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.
- 20

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

- 25 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,
- 30 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, sulietoji molekulė 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 priešūždegiminis gydymas.

Išradimo įgyvendinimas

Kaip minėta, pagrindinė šio išradimo strategija suliejant genus, yra išlaikyti tokią pačią aminorūgščių seką nenaudojant jokių linkerių (jungtukų) 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 klonu 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. Viena sėkmingiausių eksperimentų (žr. 4 pavyzdį) sulietas IFNa5 baltymas buvo ekspresuotas tarpinių kūnelių pavidalu, akumulavus 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 pradinuose 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 technologiją su maksimaliai geromis biosintezės proceso parametru 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

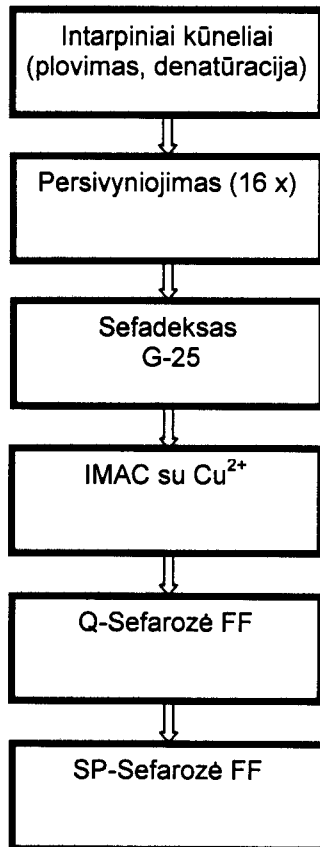
- prieinamų –S-S- ryšių (esančių kilpos ribose) sąveikos galimo persiklojimo, dėl ko susidaro nežinomos sudėties junginiai (aptikti RP-HPLC), kurie sunkiai atskiriami nuo pagrindinės suliejimo formos. Siekiant išvengti šių formų, buvo pasirinkta susivyniojimo ir gryninimo schema su mažesnėmis bendro 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 pusiausvyrinimo buferį pridedant 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 pusiausvyrinimo buferį iki 1,25 M koncentracijos ir atlikti chromatografiją analogiškai, kaip ir naudojant NaCl. Fenil-Sefarozės chromatografijos kolonėlė buvo nupusiusvirinama 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 pakrauta į kolonėlę, kurios eliuavimo srauto greitis 20 ml/min, ir išplauta su 10 mM TrisHCl, pH = 9,2, laidumas 1196 μS/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 nupusiusvirinta 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 išėigai. 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 išeiga, palyginus su ankstesnę, pridedant 1,2 M NaCl. Toliau pateikiama schema, optimizuota IFNa5 ir OSM sulietims baltymams:



50 g biomasės resuspenduojama 500 ml 0,1 M Tris-HCl buferio (pH 7,4), kurio sudėtyje yra
 5 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 tarpinių kūnelių, užšaldomos -20 °C temperatūroje.

Intarpinių kūnelių plovimas atliekamas tokiu būdu:

10 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 tarpiniai kūneliai IB buvo centrifuguojami 10000 aps./min. greičiu
 15 Backman 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 Backman centrifugoje.

Persivyniojimas vyko 2 l talpos Duran tipo karščiui atsparaus stiklo laboratorinėse stiklinėse, uždengtose tampiama plėvele. Ištirpinti (soliubilizuoti) tarpiniai kūneliai buvo 10 kartų atskiedžiami refoldingo buferiu (25 mM Gly/NaOH, 0,5 M arginino, 0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 mM GSH, 0,25 mM GSSG, pH 9,6), iki galutinio 3000 ml tūrio. Persivyniojimas vyksta

5 apytikriai 64 val. Po persivyniojimo baltymo tirpalas 30 min. centrifuguojamas $+4^\circ\text{C}$ 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. Chelatinę Sefarozės FF terpę

10 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 Cu_2SO_4 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

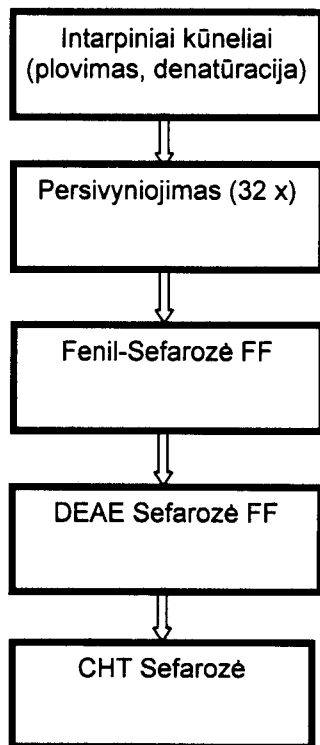
15 TrisHCl, 0,5 M NaCl, pH 7,0, 2 CV. Eliuavimą pradeda su 20 mM TrisHCl, 0,5 M NaCl, 15 CV, gradientu į 100 mM imidazolą, pH 7,0. Surinktas frakcijas, patikrinus ar jose yra sulietų baltymų, pakrauna į Q-Sefarozės FF terpę. Ši kolonėlė nupusiausvirinama su 20 mM TrisHCl, 70 mM NaCl, pH 9,0, 10 CV. Nesurištų baltymų išplovimas: 20 mM TrisHCl, 70 mM NaCl, pH 9,0, 2 CV; ir eliuavimas atliekamas su 20 mM TrisHCl, 10 CV gradientu iki

20 300 mM NaCl, pH 9,0. Baigiamajam gryninimo etapui pasirenka CM Sefarozę. Kolonėlė 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

25 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 –

30 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 tarpinių 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: tarpiniai 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.

10 Intarpinių kūnelių (IB) plovimas buvo atliekamas tokiu būdu:

- a) tarpiniai 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 (neturinčiu priedų, pH 8,0). Tai paskutinė tarpinių kūnelių preliminaraus plovimo stadija;
- 15 d) Po kiekvieno iš šių plovimo etapų tarpinius kūnelius 30 min. centrifuguoja 4 °C temperatūroje 9500 aps. / min. greičiu su Beckman J-10 rotoriu.

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
- 5 šaltomis kambario sąlygomis. Chromatografijos su fenil-Sefarozė 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.
- 10 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.
- 15 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
- 20 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.
- 25 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).

30 PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys. IFNA5-IFNA5 homodimero klonavimo schema

- Įprastoms klonavimo schemoms, naudojamoms genams sulieti, kai tikslas yra
- 35 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 schemą (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 taikiny yra pridėtojoje IFNa5/N sekoje, o antrasis taikiny – jo 3' gale. Abu AclI sukarpytus genus ekvimoliniu santykiu ligavus tarpusavyje gauna sulieto geno konstrukta, kurį paskui ekstrahuoja iš agarozės gelio.

3 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	Tm
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	GACGTAAACGTTCTTGCTAAAAGCTTTTAA	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 klono 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, sukarpona naudojant specialią restrikcijos endonukleazę, esančią IFNa5 gene – Bsu36I. Naudojant Bsu36I panašiai sukarponas 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 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 1000
 1005
 1010
 1015
 1020
 1025
 1030
 1035
 1040
 1045
 1050
 1055
 1060
 1065
 1070
 1075
 1080
 1085
 1090
 1095
 1100
 1105
 1110
 1115
 1120
 1125
 1130
 1135
 1140
 1145
 1150
 1155
 1160
 1165
 1170
 1175
 1180
 1185
 1190
 1195
 1200
 1205
 1210
 1215
 1220
 1225
 1230
 1235
 1240
 1245
 1250
 1255
 1260
 1265
 1270
 1275
 1280
 1285
 1290
 1295
 1300
 1305
 1310
 1315
 1320
 1325
 1330
 1335
 1340
 1345
 1350
 1355
 1360
 1365
 1370
 1375
 1380
 1385
 1390
 1395
 1400
 1405
 1410
 1415
 1420
 1425
 1430
 1435
 1440
 1445
 1450
 1455
 1460
 1465
 1470
 1475
 1480
 1485
 1490
 1495
 1500
 1505
 1510
 1515
 1520
 1525
 1530
 1535
 1540
 1545
 1550
 1555
 1560
 1565
 1570
 1575
 1580
 1585
 1590
 1595
 1600
 1605
 1610
 1615
 1620
 1625
 1630
 1635
 1640
 1645
 1650
 1655
 1660
 1665
 1670
 1675
 1680
 1685
 1690
 1695
 1700
 1705
 1710
 1715
 1720
 1725
 1730
 1735
 1740
 1745
 1750
 1755
 1760
 1765
 1770
 1775
 1780
 1785
 1790
 1795
 1800
 1805
 1810
 1815
 1820
 1825
 1830
 1835
 1840
 1845
 1850
 1855
 1860
 1865
 1870
 1875
 1880
 1885
 1890
 1895
 1900
 1905
 1910
 1915
 1920
 1925
 1930
 1935
 1940
 1945
 1950
 1955
 1960
 1965
 1970
 1975
 1980
 1985
 1990
 1995
 2000
 2005
 2010
 2015
 2020
 2025
 2030
 2035
 2040
 2045
 2050
 2055
 2060
 2065
 2070
 2075
 2080
 2085
 2090
 2095
 2100
 2105
 2110
 2115
 2120
 2125
 2130
 2135
 2140
 2145
 2150
 2155
 2160
 2165
 2170
 2175
 2180
 2185
 2190
 2195
 2200
 2205
 2210
 2215
 2220
 2225
 2230
 2235
 2240
 2245
 2250
 2255
 2260
 2265
 2270
 2275
 2280
 2285
 2290
 2295
 2300
 2305
 2310
 2315
 2320
 2325
 2330
 2335
 2340
 2345
 2350
 2355
 2360
 2365
 2370
 2375
 2380
 2385
 2390
 2395
 2400
 2405
 2410
 2415
 2420
 2425
 2430
 2435
 2440
 2445
 2450
 2455
 2460
 2465
 2470
 2475
 2480
 2485
 2490
 2495
 2500
 2505
 2510
 2515
 2520
 2525
 2530
 2535
 2540
 2545
 2550
 2555
 2560
 2565
 2570
 2575
 2580
 2585
 2590
 2595
 2600
 2605
 2610
 2615
 2620
 2625
 2630
 2635
 2640
 2645
 2650
 2655
 2660
 2665
 2670
 2675
 2680
 2685
 2690
 2695
 2700
 2705
 2710
 2715
 2720
 2725
 2730
 2735
 2740
 2745
 2750
 2755
 2760
 2765
 2770
 2775
 2780
 2785
 2790
 2795
 2800
 2805
 2810
 2815
 2820
 2825
 2830
 2835
 2840
 2845
 2850
 2855
 2860
 2865
 2870
 2875
 2880
 2885
 2890
 2895
 2900
 2905
 2910
 2915
 2920
 2925
 2930
 2935
 2940
 2945
 2950
 2955
 2960
 2965
 2970
 2975
 2980
 2985
 2990
 2995
 3000
 3005
 3010
 3015
 3020
 3025
 3030
 3035
 3040
 3045
 3050
 3055
 3060
 3065
 3070
 3075
 3080
 3085
 3090
 3095
 3100
 3105
 3110
 3115
 3120
 3125
 3130
 3135
 3140
 3145
 3150
 3155
 3160
 3165
 3170
 3175
 3180
 3185
 3190
 3195
 3200
 3205
 3210
 3215
 3220
 3225
 3230
 3235
 3240
 3245
 3250
 3255
 3260
 3265
 3270
 3275
 3280
 3285
 3290
 3295
 3300
 3305
 3310
 3315
 3320
 3325
 3330
 3335
 3340
 3345
 3350
 3355
 3360
 3365
 3370
 3375
 3380
 3385
 3390
 3395
 3400
 3405
 3410
 3415
 3420
 3425
 3430
 3435
 3440
 3445
 3450
 3455
 3460
 3465
 3470
 3475
 3480
 3485
 3490
 3495
 3500
 3505
 3510
 3515
 3520
 3525
 3530
 3535
 3540
 3545
 3550
 3555
 3560
 3565
 3570
 3575
 3580
 3585
 3590
 3595
 3600
 3605
 3610
 3615
 3620
 3625
 3630
 3635
 3640
 3645
 3650
 3655
 3660
 3665
 3670
 3675
 3680
 3685
 3690
 3695
 3700
 3705
 3710
 3715
 3720
 3725
 3730
 3735
 3740
 3745
 3750
 3755
 3760
 3765
 3770
 3775
 3780
 3785
 3790
 3795
 3800
 3805
 3810
 3815
 3820
 3825
 3830
 3835
 3840
 3845
 3850
 3855
 3860
 3865
 3870
 3875
 3880
 3885
 3890
 3895
 3900
 3905
 3910
 3915
 3920
 3925
 3930
 3935
 3940
 3945
 3950
 3955
 3960
 3965
 3970
 3975
 3980
 3985
 3990
 3995
 4000
 4005
 4010
 4015
 4020
 4025
 4030
 4035
 4040
 4045
 4050
 4055
 4060
 4065
 4070
 4075
 4080
 4085
 4090
 4095
 4100
 4105
 4110
 4115
 4120
 4125
 4130
 4135
 4140
 4145
 4150
 4155
 4160
 4165
 4170
 4175
 4180
 4185
 4190
 4195
 4200
 4205
 4210
 4215
 4220
 4225
 4230
 4235
 4240
 4245
 4250
 4255
 4260
 4265
 4270
 4275
 4280
 4285
 4290
 4295
 4300
 4305
 4310
 4315
 4320
 4325
 4330
 4335
 4340
 4345
 4350
 4355
 4360
 4365
 4370
 4375
 4380
 4385
 4390
 4395
 4400
 4405
 4410
 4415
 4420
 4425
 4430
 4435
 4440
 4445
 4450
 4455
 4460
 4465
 4470
 4475
 4480
 4485
 4490
 4495
 4500
 4505
 4510
 4515
 4520
 4525
 4530
 4535
 4540
 4545
 4550
 4555
 4560
 4565
 4570
 4575
 4580
 4585
 4590
 4595
 4600
 4605
 4610
 4615
 4620
 4625
 4630
 4635
 4640
 4645
 4650
 4655
 4660
 4665
 4670
 4675
 4680
 4685
 4690
 4695
 4700
 4705
 4710
 4715
 4720
 4725
 4730
 4735
 4740
 4745
 4750
 4755
 4760
 4765
 4770
 4775
 4780
 4785
 4790
 4795
 4800
 4805
 4810
 4815
 4820
 4825
 4830
 4835
 4840
 4845
 4850
 4855
 4860
 4865
 4870
 4875
 4880
 4885
 4890
 4895
 4900
 4905
 4910
 4915
 4920
 4925
 4930
 4935
 4940
 4945
 4950
 4955
 4960
 4965
 4970
 4975
 4980
 4985
 4990
 4995
 5000
 5005
 5010
 5015
 5020
 5025
 5030
 5035
 5040
 5045
 5050
 5055
 5060
 5065
 5070
 5075
 5080
 5085
 5090
 5095
 5100
 5105
 5110
 5115
 5120
 5125
 5130
 5135
 5140
 5145
 5150
 5155
 5160
 5165
 5170
 5175
 5180
 5185
 5190
 5195
 5200
 5205
 5210
 5215
 5220
 5225
 5230
 5235
 5240
 5245
 5250
 5255
 5260
 5265
 5270
 5275
 5280
 5285
 5290
 5295
 5300
 5305
 5310
 5315
 5320
 5325
 5330
 5335
 5340
 5345
 5350
 5355
 5360
 5365
 5370
 5375
 5380
 5385
 5390
 5395
 5400
 5405
 5410
 5415
 5420
 5425
 5430
 5435
 5440
 5445
 5450
 5455
 5460
 5465
 5470
 5475
 5480
 5485
 5490
 5495
 5500
 5505
 5510
 5515
 5520
 5525
 5530
 5535
 5540
 5545
 5550
 5555
 5560
 5565
 5570
 5575
 5580
 5585
 5590
 5595
 5600
 5605
 5610
 5615
 5620
 5625
 5630
 5635
 5640
 5645
 5650
 5655
 5660
 5665
 5670
 5675
 5680
 5685
 5690
 5695
 5700
 5705
 5710
 5715
 5720
 5725
 5730
 5735
 5740
 5745
 5750
 5755
 5760
 5765
 5770
 5775
 5780
 5785
 5790
 5795
 5800
 5805
 5810
 5815
 5820
 5825
 5830
 5835
 5840
 5845
 5850
 5855
 5860
 5865
 5870
 5875
 5880
 5885
 5890
 5895
 5900
 5905
 5910
 5915
 5920
 5925
 5930
 5935
 5940
 5945
 5950
 5955
 5960
 5965
 5970
 5975
 5980
 5985
 5990
 5995
 6000
 6005
 6010
 6015
 6020
 6025
 6030
 6035
 6040
 6045
 6050
 6055
 6060
 6065
 6070
 6075
 6080
 6085
 6090
 6095
 6100
 6105
 6110
 6115
 6120
 6125
 6130
 6135
 6140
 6145
 6150
 6155
 6160
 6165
 6170
 6175
 6180
 6185
 6190
 6195
 6200
 6205
 6210
 6215
 6220
 6225
 6230
 6235
 6240
 6245
 6250
 6255
 6260
 6265
 6270
 6275
 6280
 6285
 6290
 6295
 6300
 6305
 6310
 6315
 6320
 6325
 6330
 6335
 6340
 6345
 6350
 6355
 6360
 6365
 6370
 6375
 6380
 6385
 6390
 6395
 6400
 6405
 6410
 6415
 6420
 6425
 6430
 6435
 6440
 6445
 6450
 6455
 6460
 6465
 6470
 6475
 6480
 6485
 6490
 6495
 6500
 6505
 6510
 6515
 6520
 6525
 6530
 6535
 6540
 6545
 6550
 6555
 6560
 6565
 6570
 6575
 6580
 6585
 6590
 6595
 6600
 6605
 6610
 6615
 6620
 6625
 6630
 6635
 6640
 6645
 6650
 6655
 6660
 6665
 6670
 6675
 6680
 6685
 6690
 6695
 6700
 6705
 6710
 6715
 6720
 6725
 6730
 6735
 6740
 6745
 6750
 6755
 6760
 6765
 6770
 6775
 6780
 6785
 6790
 6795
 6800
 6805
 6810
 6815
 6820
 6825
 6830
 6835
 6840
 6845
 6850
 6855
 6860
 6865
 6870
 68

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 vektorių pJET1.2, ir po to – į E.coli JM109 kamieną. Toks plazmidės ir kamieno derinys leido pJET plazmidėje sukurti

5 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 klonų stabilumą, pirmasis liguotų produktų transformavimo etapas buvo atliktas į E.coli JM109 kamieną. Po pirmojo klonavimo įtarpos dydis

10 patikrinamas plazmidės DNR sukarpant 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.

15 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

20 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.

25

5 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
IFNA2B-FOR-A5	TACGTCGTAAGGAATGTGATCGCCGCA	nėra	68,9°C
IFNA2B-REV-HIND	AAAAAGCTTCTATTCCTTAGAAC	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 klonų stabilumą, pirmasis liguotų produktų transformavimo etapas atliekamas į E.coli JM109 kamieną. Po pirmojo klonavimo įtaros dydis patikrinamas, plazmidės DNR sukarpant 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	ATTATCATATGTGTGATCTGCCGCAGA	NdeI (CATATG)	63,9°C
OSM-RSRR-REV-HIND	TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGGTT	HindIII (AAGCTT)	65,1°C
IFNA5-REV-(-stop)	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8°C
OSM-AAI-ACL	TTAACGTTTACGTCGTAAGGAAGCGGCTATAGGCAGCT	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.

AcII sukarpyti produktai ekvimoliniais santykiais liguojami kartu su T4 DNR ligaze. Gautas mišinys gryninamas, iš agarozės gelio ištraukiant 1100 bazių porų ilgio fragmentą.

- 5 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

15

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 pradmenį OSM-FOR-NDE ir atvirkštinį pradmenį 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.

20

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 pradmenį IFNA5-FOR-BSA ir atvirkštinį pradmenį IFNA5-REV-HIND. Paskui amplifikuotas ir išgrynintas IFNa5 genas pridėtojoje OSM sekoje sukarpomamas naudojant BsaWI taikinį.

25

7 lentelė

Pradmuo	Seka (5'→3')	Restrikcijos endonukleazės vieta	Tm
OSM-FOR-NDE	AAACATATGGCGGCTATAGGCAGC	NdeI (CATATG)	66,2°C
OSM-REV-(-STOP)	TCTCCGGCTCCGGTTCGG	BsaWI (ACCGGA)	65,7°C
IFNA5-FOR-BSA	AGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGATGTGATCTGCCGCAGA	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 sukarpomamas 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 10 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).

Ląstelėms 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.

30 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 (apskaičiuota 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
- 5 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 (apskaičiuota pagal bendrą baltymų kiekį)	47.7±8.5
IFNa2b-IFNa5, mg/l ląstelių suspensijos (pagal bendrą baltymų kiekį)	1364.1±72.8

10

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

- Chromatografinis gryninimas vykdytas tokiomis pakopomis: hidrofobinės sąveikos
- 15 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
- 20 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

5 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

10 intarpiniai kūneliai buvo suspenduoti 60 ml 25 mM Gly/NaOH buferio, pH 9,6, kurio sudėtyje buvo 6 M guanidino hidrochlorido (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

15 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.

20 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

25 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

30 šios kolonėlės gauto sulieto baltymo porcija buvo perskirta į dvi dalis, iš kurių viena buvo acetatinio buferio sistemoje, o kitoje buferis pakeistas į PBS. Abi 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.

10 **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.
- 15 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
- 20 Aptikimo bangų ilgis: 280 nm
- Srauto greitis: 1 ml/min.
- Išgryninto IFN α 2b-IFN α 5 sulieto baltymo SE-HPLC rezultatai pateikti Fig. 6. Iš šio chromatografinio vaizdo matyti, kad sulieto baltymo monomerų kiekis yra daugiau nei 98%.

25 **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.
- 30 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 □
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

5 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

5 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

10 dekantuojamas ir šulinėliai atsargiai praplaunami vandeniu, džiovinami ir pridedama eliuavimo tirpalo (50% etanolio su 0,05% acto rūgšties). Kristaliniu violetiniu dažytų šulinėlių sugertis nustatoma mikroplokšteliniu skaitytuvu (μ Quant, BioTek) ties 570 nm.

Įvairių IFN α 5 preparatų biologinis aktyvumas buvo apskaičiuotas pagal tarptautinį

15 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

20 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

25 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

30 būdingas toks pat biologinis aktyvumas, kaip ir IFN α 5 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
5 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
10 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-
15 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
20 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 Biotechnologines farmacijos centras "BIOTECHPHARMA"
 <120> SULIETI INTEREFERONO-ALFA 5 BALTYMAI SU KITU CITOKINU IR JŲ
 5 GAMYBOS BŪDAS
 <130> 2830
 <160> 24
 <170> PatentIn version 3.5
- 10 <210> 1
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
- 15
 Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
 1 5 10 15
- 20 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
- 25 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
- 30 Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
 85 90 95
- 35 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
- 40 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

5 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

10 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

15 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
 20 260 265 270

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

25 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

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

<210> 2
 35 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

40 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				
5	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		
10	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			
15	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	
20		130					135					140					
	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	
	145				150						155					160	
25	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			
30	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	
35		210					215					220					
	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	
	225					230					235				240		
40	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

5 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

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

15 <210> 3
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

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

25 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

30 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

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

40 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
 5 145 150 155 160

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

10 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

15 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
 20 225 230 235 240

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

25 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

30 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
 35 305 310 315 320

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

40
 <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	
5	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
10			35					40					45			
	Phe	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln
		50					55					60				
15	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	
20	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
25			115					120					125			
	Thr	Leu	Tyr	Leu	Thr	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val
		130					135					140				
30	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	
35	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
40			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

5 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

10 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

15 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
 20 325 330 335

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

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

<210> 5
 <211> 363
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly
 35 1 5 10 15

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

40 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	
5	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			
10	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					
15	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	
20				165					170					175			
	Phe	Met	His	Ser	Val	Gly	Arg	Val	Phe	Ser	Lys	Trp	Gly	Glu	Ser	Pro	
				180				185					190				
25	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						
30	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	
35				245					250					255			
	Met	Ile	Gln	Gln	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	
			260					265					270				
40	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	
5	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	
10	Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu	
	355 360	
15	<210> 6	
	<211> 1002	
	<212> DNR	
	<213> Dirbtinė seka	
	<220>	
20	<223> Sintetinė koduojanti seka	
	<400> 6	
	atgtgtgac tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca	60
	cagatgggtc gtatctctcc ttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttcct	120
25	caggaggagt ttgatggcaa ccagttccag aaggctcaag ccatctctgt cctccatgag	180
	atgatccagc agacctcaa tctcttcagc acaaaggact catctgtctac ttgggatgag	240
	acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt	300
	atgatgcagg aggttggagt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatcctgact	360
	gtgagaaaat actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagccctgt	420
30	gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatcctct cttatcagc aaacttgcaa	480
	gaacgtttac gtcgtaagga atgtgatctg ccgcagaccc actccctgtc taaccgtcgt	540
	actctgatga tcatggcaca gatgggtcgt atctctcctt tctcctgcct gaaggacaga	600
	catgactttg gatttctca ggaggagtt gatggcaacc agttccagaa ggctcaagcc	660
	atctctgtcc tccatgagat gatccagcag acctcaatc tcttcagcac aaaggactca	720
35	tctgtactt gggatgagac acttctagac aaattctaca ctgaacttta ccagcagctg	780
	aatgacctgg aagcctgtat gatgcaggag gttggagtgg aagacactcc tctgatgaat	840
	gtggactcta tctgactgt gagaaaatac ttcaaagaa tcactctcta tctgacagag	900
	aagaaataca gccctgtgc atgggaggtt gtcagagcag aaatcatgag atccttctct	960
	ttatcagcaa acttgcaaga acgtttacgt cgtaaggaat aa	1002

	<210>	7	
	<211>	999	
	<212>	DNR	
5	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinė koduojanti seka	
	<400>	7	
	atgtgtgac	tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca	60
10	cagatgggtc	gtatctctcc ttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttct	120
	caggaggagt	ttgatggcaa ccagttccag aaggctcaag ccatctctgt cctccatgag	180
	atgatccagc	agacattcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctac ttgggatgag	240
	acacttctag	acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt	300
	atgatgcagg	aggttggagt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatcctgact	360
15	gtgagaaaat	actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt	420
	gcatgggagg	ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct ctttatcagc aaactgcaa	480
	gaacgtttac	gtcgttaagga atgtgatctg ccgcagactc actctctggg ttctcgtcgt	540
	actctgatgc	tgctggctca gatgcgtcgt atctctctt tctcttgct gaaagaccgt	600
	catgacttcg	gtttcccgca ggaagagttc ggtaaccagt tccagaaagc tgaaactatc	660
20	cctgtttcgc	atgaaatgat ccagcaaacc ttcaacctgt tctctactaa agactcttct	720
	gctgcttggg	acgaaaccct gctggacaaa ttctactg aactgtacca gcaactcaac	780
	gacctcgagg	ctgtgttat tcagggcgtt ggtgttaccg aaactccgct gatgaaagag	840
	gatagcatcc	tggtgttcg caagtatttc cagcgtatca ctctttacct gaaggaaaag	900
	aagtatagcc	cgtgtgcttg ggaagttgt cgtgctgaga tcatgcgttc cttctccctg	960
25	tctactaacc	tgcaggaatc tctgcgttct aaggaatag	999
	<210>	8	
	<211>	999	
	<212>	DNR	
30	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinė koduojanti seka	
	<400>	8	
35	atgtgtgac	tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct	60
	cagatgcgtc	gtatctctct ttctcttgc ctgaaagacc gtcatgactt cggtttcccg	120
	caggaagagt	tcggtaacca gttccagaaa gctgaaacta tccctgttct gcatgaaatg	180
	atccagcaaa	tcttcaacct gttctctact aaagactctt ctgctgcttg ggacgaaacc	240

	ctgctggaca aattctacac tgaactgtac cagcaactca acgacctcga ggcttgtgtt	300
	attcagggcg ttggtgttac cgaaactccg ctgatgaaag aggatagcat cctggctgtt	360
	cgcaagtatt tccagcgtat cactctttac ctgaaggaaa agaagtatag cccgtgtgct	420
	tgggaagttg ttctgtctga gatcatgcgt tccttctccc tgttactaa cctgcaggaa	480
5	tctctgcgtt ctaaggaatg tgatctgccg cagacccact cctgtctaa ccgtctact	540
	ctgatgatca tggcacagat gggctgtatc tctccttct cctgcctgaa ggacagacat	600
	gactttggat ttctcagga ggagttgat ggcaaccagt tccagaaggc tcaagccatc	660
	tctgtctcc atgagatgat ccagcagacc ttcaatctct tcagcacaaa ggactcatct	720
	gctacttggg atgagacact tctagacaaa ttctacttg aactttacca gcagctgaat	780
10	gacctggaag cctgtatgat gcaggaggtt ggagtggaag acactcctct gatgaatgtg	840
	gacttatcc tgactgtgag aaaatacttt caaagaatca ctcttatct gacagagaag	900
	aaatacagcc ctgtgcatg ggaggtgtc agagcagaaa tcatgagatc ctctcttta	960
	tcagcaaact tgcaagaacg ttacgtcgt aaggaataa	999
15	<210> 9	
	<211> 1092	
	<212> DNR	
	<213> Dirbtinė seka	
	<220>	
20	<223> Sintetinė koduojanti seka	
	<400> 9	
	atgtgtgatc tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca	60
	cagatgggtc gtatctctcc ttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttct	120
25	caggaggagt ttgatggcaa ccagttccag aaggctcaag ccattctgt cctccatgag	180
	atgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgtac ttgggatgag	240
	acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt	300
	atgatgcagg aggttggagt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatctgact	360
	gtgagaaaat actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagccctgt	420
30	gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct cttatcagc aaactgcaa	480
	gaacgtttac gtcgtaagga agcggctata ggcagctgct cgaaagagta ccgctgtctc	540
	cttggccagc tccagaagca gacagatctc atgcaggaca ccagcagact cctggacccc	600
	tatatacgta tccaaggcct ggatgttctt aaactgagag agcactgcag ggagcgcccc	660
	ggggccttcc ccagttagga gacctgagg gggctgggca ggcggggctt cctgcagacc	720
35	ctcaatgcca cactgggctg cgtcctgcac agactggccg acttagagca gcgcctcccc	780
	aaggcccagg atttgagag gtctgggctg aacatcgagg acttgagaa gctgcagatg	840

	gcgaggccga acatcctcgg gctcaggaac aacatctact gcatggccca gctgctggac	900
	aactcagaca cggctgagcc cacgaaggct ggccgggggg cctctcagcc gccaccccc	960
	accctgcct cggatgcttt tcagcgcaag ctggagggtc gcaggttcct gcatggctac	1020
	catcgcttca tgcactcagt ggggcgggtc ttcagcaagt ggggggagag cccgaaccgg	1080
5	agccggagat aa	1092
	<210> 10	
	<211> 1092	
	<212> DNR	
10	<213> Dirbtinė seka	
	<220>	
	<223> Sintetinė koduojanti seka	
	<400> 10	
15	atggcggcta taggcagctg ctcgaaagag taccgcgtgc tccttgcca gctccagaag	60
	cagacagatc tcatgcagga caccagcaga ctctggacc cctatatacg tatccaaggc	120
	ctggatgtc ctaaactgag agagcactgc agggagcgcc ccggggcctt cccagtgag	180
	gagaccctga gggggctggg caggcggggc ttctgcaga ccctcaatgc cacactgggc	240
	tgcgtctgc acagactggc cgacttagag cagcgctcc ccaaggccca ggatttgag	300
20	aggtctgggc tgaacatcga ggacttgag aagctgcaga tggcgaggcc gaacatcctc	360
	gggctcagga acaacatcta ctgcatggcc cagctgctgg acaactcaga cacggctgag	420
	cccacgaagg ctggccgggg ggctctcag ccgccaccc cccccctgc ctcgatgct	480
	tttcagcgca agctggaggg ctgcaggttc ctgcatggct accatcgctt catgcactca	540
	gtggggcggg tcttcagcaa gtggggggag agcccgaacc ggagccggag atgtgatctg	600
25	ccgcagaccc actccctgtc taaccgtcgt actctgatga tcatggcaca gatgggtcgt	660
	atctctctt tctctgcct gaaggacaga catgacttg gatttctca ggaggagttt	720
	gatggcaacc agttccagaa ggctcaagcc atctctgtcc tccatgagat gatccagcag	780
	acctcaatc tcttcagcac aaaggactca tctgtactt gggatgagac acttctagac	840
	aaattctaca ctgaacttta ccagcagctg aatgacctgg aagcctgtat gatgcaggag	900
30	gttgagtggt aagacactcc tctgatgaat gtggactcta tctgactgt gagaaaatac	960
	tttcaaagaa tctctctcta tctgacagag aagaaataca gcccttgtc atgggaggtt	1020
	gtcagagcag aaatcatgag atccttctt ttatcagcaa acttgcaaga acgtttacgt	1080
	cgtaaggaat aa	1092
35	<210> 11	
	<211> 27	
	<212> DNR	

	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	11	
5			
		attatcatat gtgtgatctg ccgcaga	27
	<210>	12	
10	<211>	25	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
15	<400>	12	
		ttccttacga cgtaaacggt cttgc	25
	<210>	13	
20	<211>	41	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
25	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	13	
		ttccttacga cgtaaacggt cttgctgtga tctgccgcag a	41
	<210>	14	
30	<211>	30	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
35	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	14	
		gacgtaaacg ttcttgctaa aagcttttaa	30
40			
	<210>	15	
	<211>	24	

	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
5	<400>	15	
	ttaacatatg tgtgatctgc cgca		24
	<210>	16	
10	<211>	30	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
15	<400>	16	
	ttccttagaa cgcagagatt cctgcaggtt		30
20	<210>	17	
	<211>	48	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
25	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	17	
	tttctgcagg aatctctgcg ttctaaggaa tgtgatctgc cgcagacc		48
30			
	<210>	18	
	<211>	27	
	<212>	DNR	
35	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	18	
40	ttaagcttc tatctccggc tccggtt		27

	<210>	19	
	<211>	38	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
5	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	19	
	ttaacgttta cgtcgtaagg aagcggctat aggcagct		38
10			
	<210>	20	
	<211>	24	
	<212>	DNR	
15	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	20	
20	aaacatatgg cggctatagg cagc		24
	<210>	21	
	<211>	18	
25	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	21	
30			
	tctccggctc cggttcgg		18
	<210>	22	
35	<211>	39	
	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
40	<400>	22	
	agagcccga cggagccgg agatgtgatc tgccgcaga		39

	<210>	23	
	<211>	28	
	<212>	DNR	
5	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	23	
10	tacgtcgtaa aggaatgtga tcgccgca		28
	<210>	24	
	<211>	23	
15	<212>	DNR	
	<213>	Dirbtinė seka	
	<220>		
	<223>	Sintetinis pradmuo	
	<400>	24	
20	aaaaagcttc tattccttag aac		23

Išradimo apibrėžtis

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

5	IFNa5 – X	X - IFNa5
	(I)	(II)

kur suliejimo partneris X yra kitas interferonas alfa arba citokinas.

10

2. Sulietas baltymas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad IFNa5 yra žmogaus rekombinantinis interferonas-alfa 5, ir X yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš IFNa5, INFa2b ir onkostatino.

15

3. Sulietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad IFNa5 yra homodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 1 arba seka, kurios identiškumas bent 95%.

20

4. Sulietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra IFNa2b-IFNa5 heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 2 arba seka, kurios identiškumas bent 95%.

25

5. Sulietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra IFNa5-IFNa2b heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 3 arba seka, kurios identiškumas bent 95%.

30

6. Sulietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra IFNa5-OSM heterodimeras, kurio aminorūgščių seka yra SEQ ID No: 4 arba seka, kurios identiškumas bent 95%.

30

7. Sulietas baltymas pagal 1 arba 2 punktą, besiskiriantis 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.
- 5 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;
- 15 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
- 20 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;
- 25 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
- 30 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 glutathiono 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.

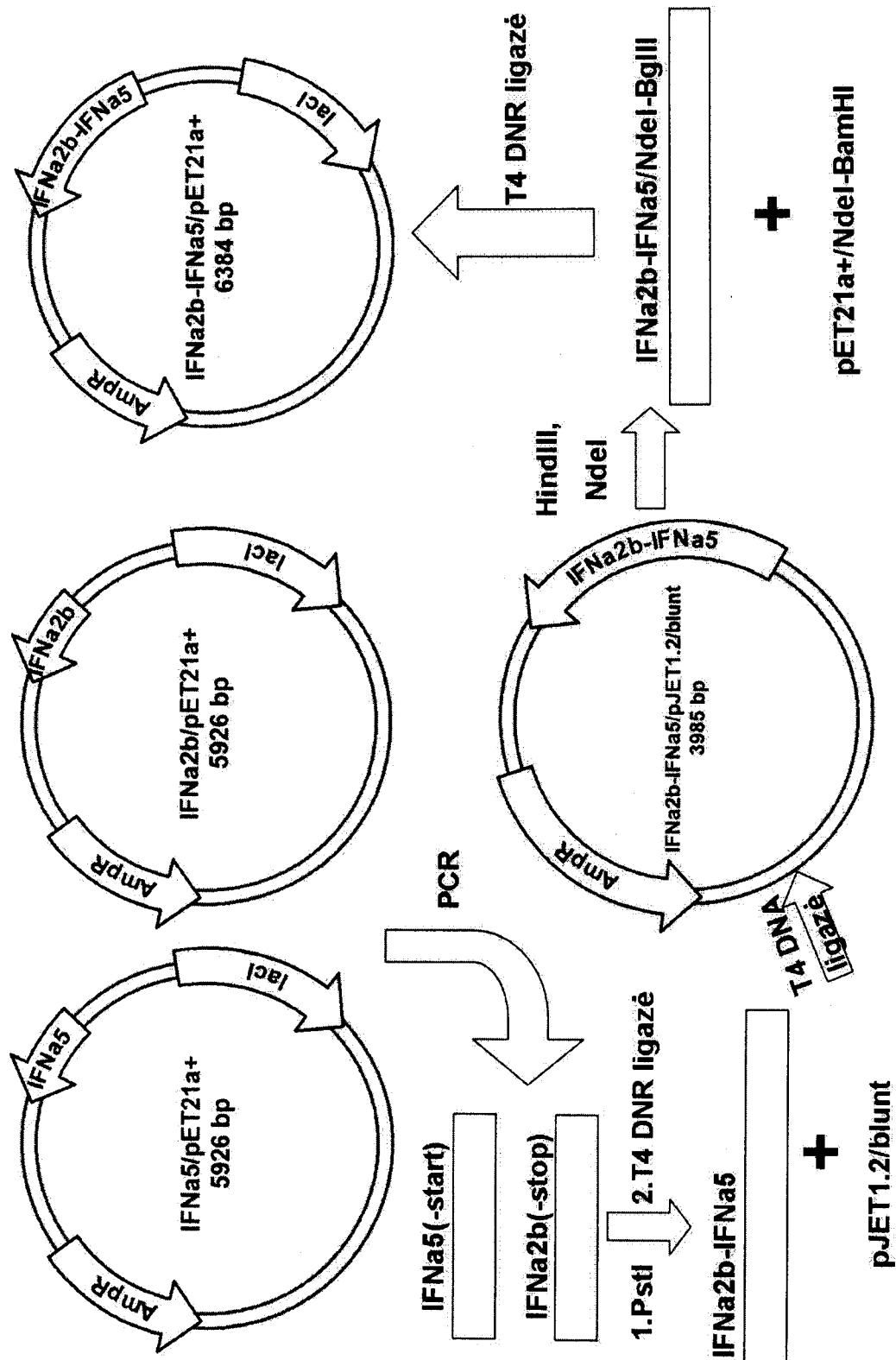
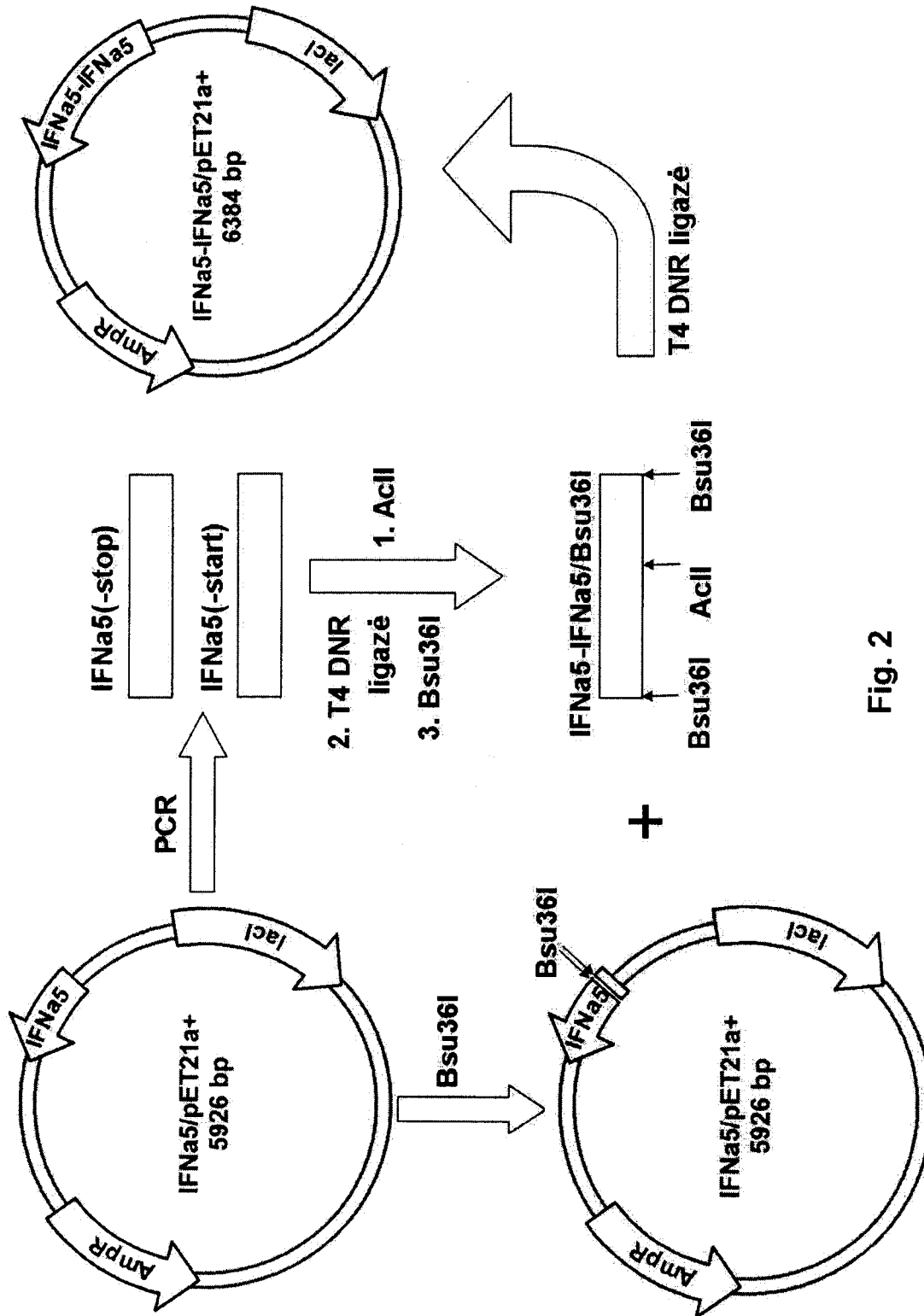


Fig. 1



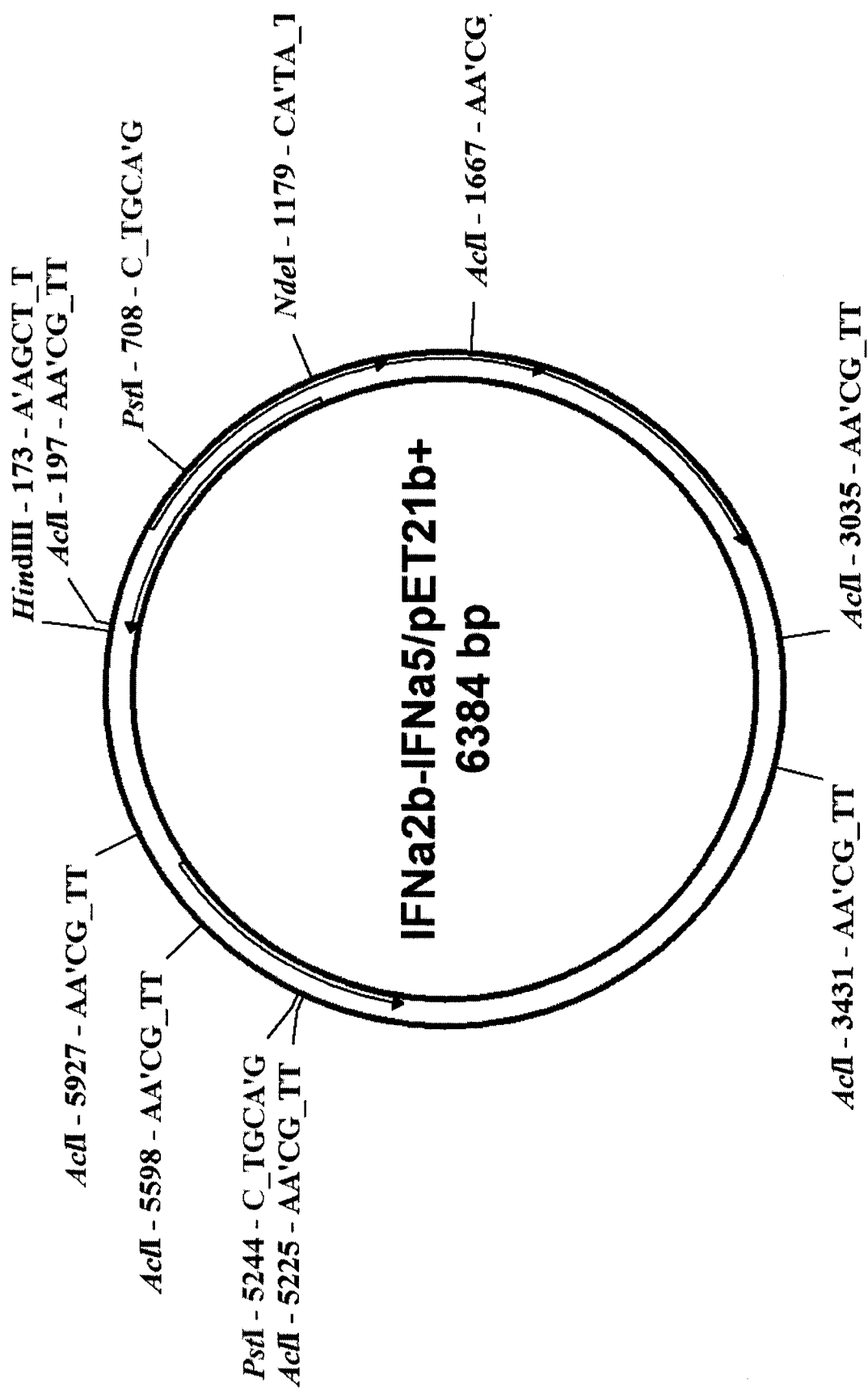


Fig. 3

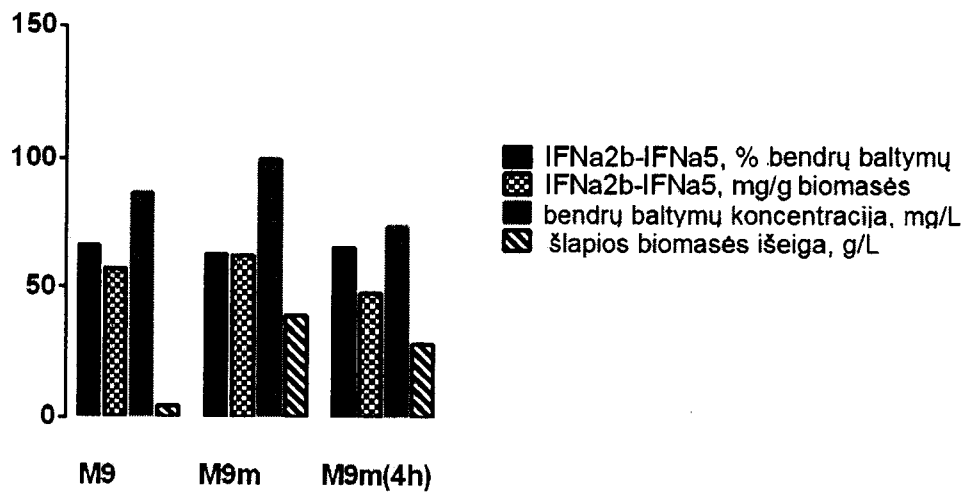
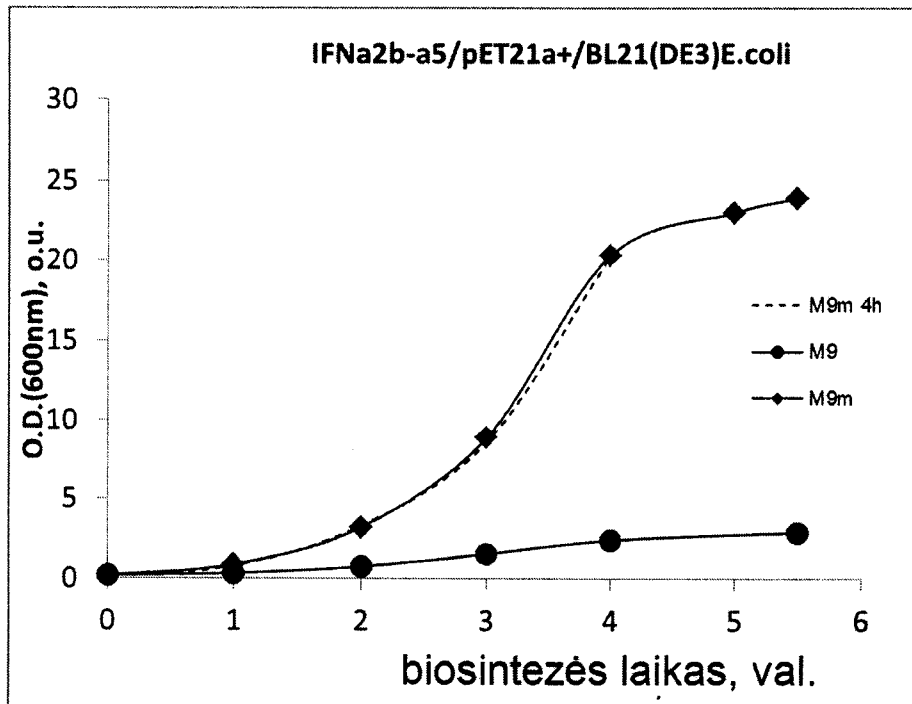


Fig. 4

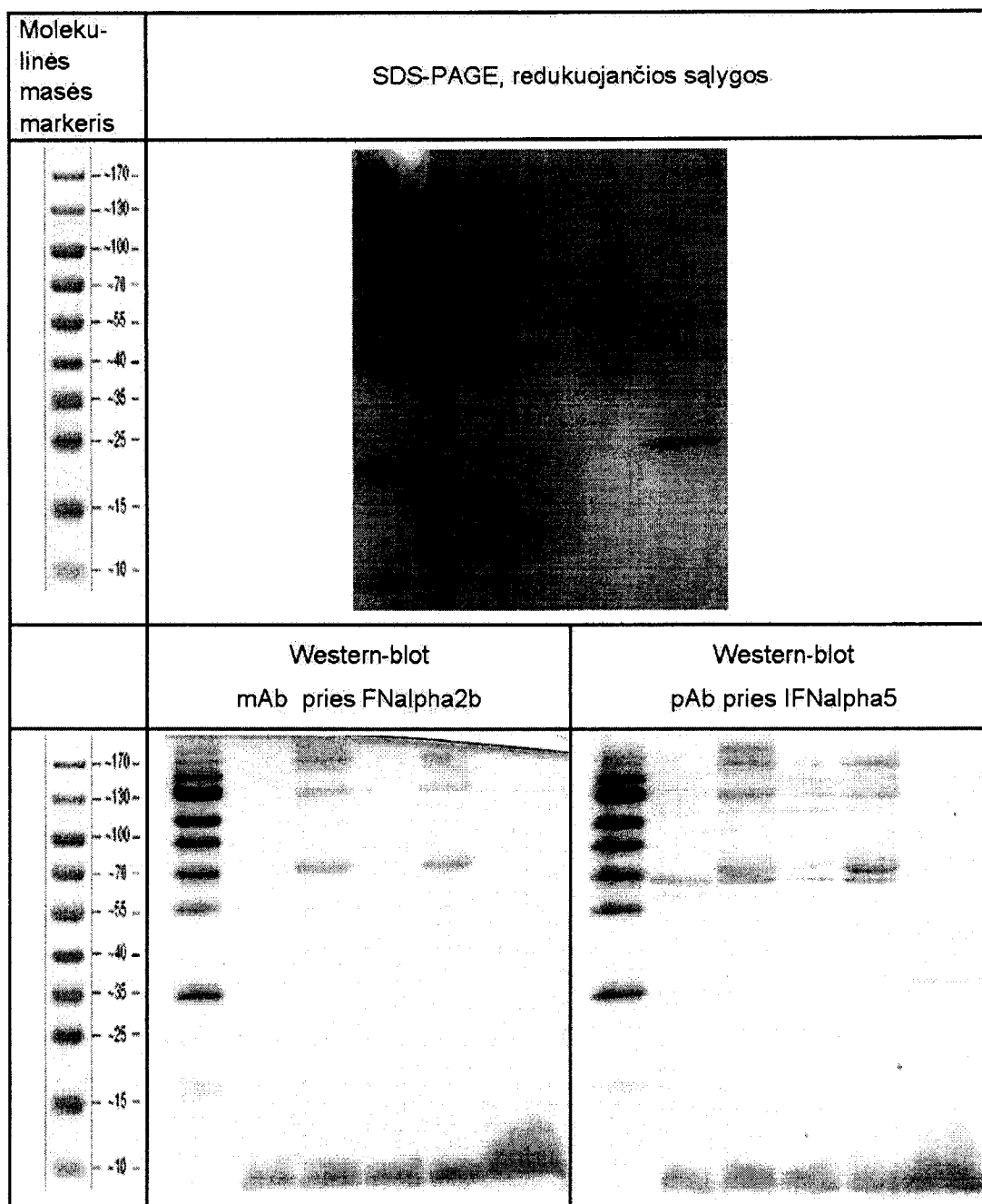


Fig. 5

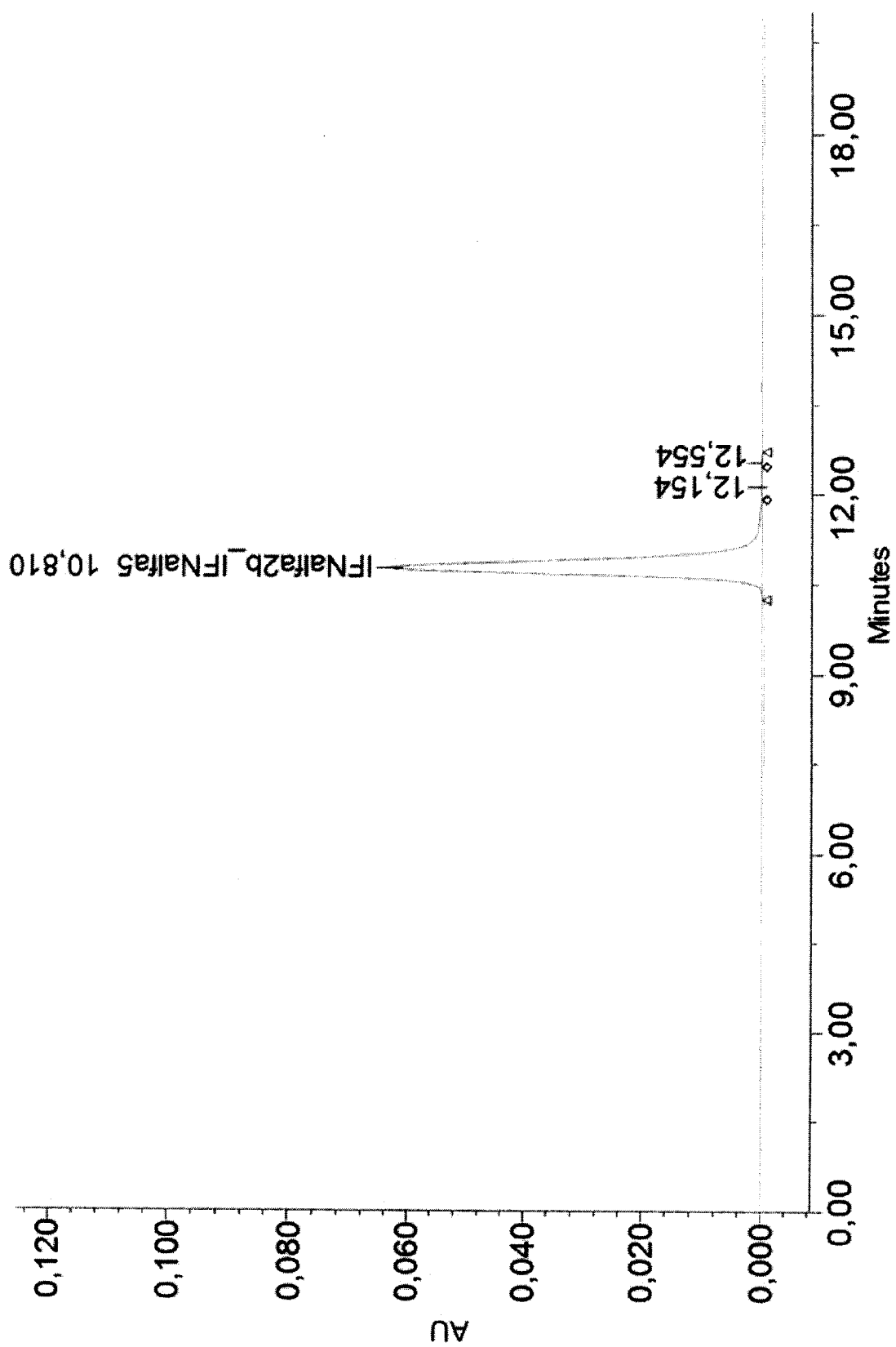
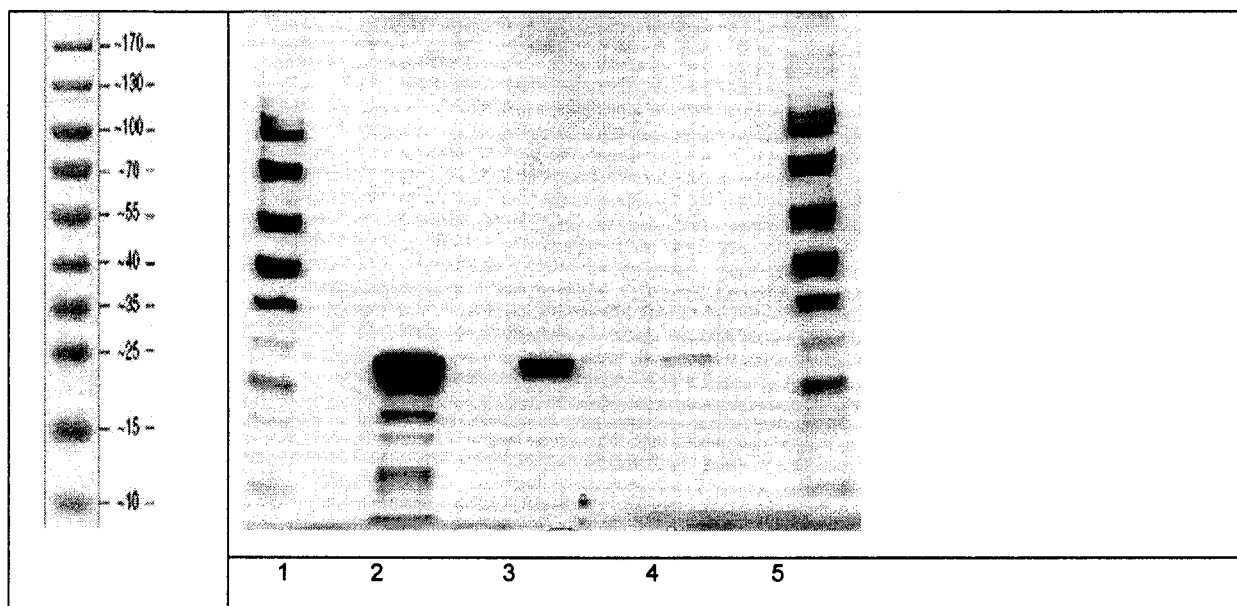


Fig. 6

**Fig. 7**

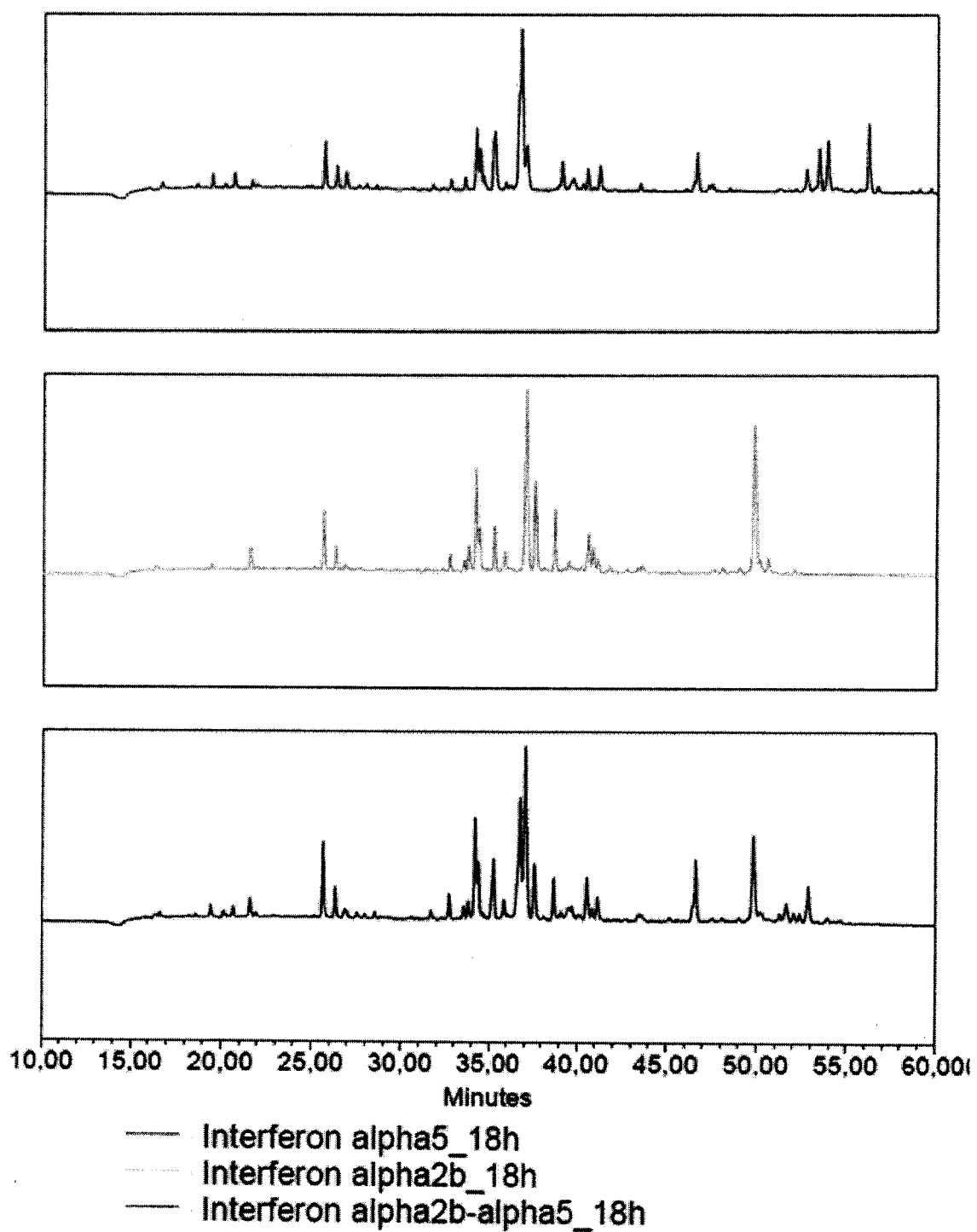


Fig. 8