

①9



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

①1 1007908

①2 C OCTROOI²⁰

②1 Aanvraag om octrooi: 1007908

②2 Ingediend: 24.12.97

⑤1 Int.Cl.⁶

G03C1/005, C12N15/12, C12N15/74,
C12P21/00, G03C1/047

④1 Ingeschreven:
25.06.99

④7 Dagtekening:
25.06.99

④5 Uitgegeven:
01.09.99 I.E. 99/09

⑦3 Octrooihouder(s):
Fuji Photo Film B.V. te Tilburg.

⑦2 Uitvinder(s):
George Valentino van Heerde te Oosterhout
Alexis Cornelis van Rijn te Rosmalen
Jan Bastiaan Bouwstra te Bilthoven
Frederik Anton de Wolf te Bunnik
Andreas Mooibroek te Renkum
Marc Willem Theodoor Werten te Wageningen
Richele Deodata Wind te Wageningen
Tanja Jacoba van den Bosch te Zeist

⑦4 Gemachtigde:
Ir. L.C. de Bruljn c.s. te 2517 KZ Den Haag.

⑤4 Zilverhalide-emulsies met recombinant collageen die geschikt zijn voor fotografische toediening alsmede de bereiding daarvan.

⑤7 Een dunne tabulaire zilverhalide-emulsie waarvan de tabulaire korrels meer dan 75% van het totale korrel-oppervlakte dat geprojecteerd wordt voor zijn rekening neemt, welke emulsie zilverhalidekorrels omvat die kernvorming hebben ondergaan bij aanwezigheid van een peptiseermiddel en daarna bij aanwezigheid van het peptiseermiddel zijn gegroeid waarbij het peptiseermiddel in hoofdzaak zuiver collageenachtig materiaal is dat is bereid door genetische manipulatie van natief nucleïnezuur dat voor collageen codeert, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die meer dan vier verschillende aminozuren omvat. Een werkwijze voor het bereiden van de emulsie. Een werkwijze voor het produceren van collageenachtig recombinant-polypeptide omvattende expressie van een voor collageenachtig polypeptide coderende nucleïnezuur-sequentie door een microorganisme in een hoeveelheid meer dan 0,95 g per liter, waarbij het recombinant-collageen vrij is van helixstructuur en waarbij de expressie bij voorkeur geschied in een microorganisme anders dan *E. coli* of *Saccaromyces cerevisiae*.

NL C 1007908

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekeningen.

TITEL

Zilverhalide-emulsies met recombinant collageen die geschikt zijn voor fotografische toediening alsmede de bereiding daarvan.

5

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op verbeterde fotografische films en verbeterde werkwijze ter vervaardiging van
10 genoemde films. In het bijzonder wordt de verbetering bewerkstelligd door toepassing van recombinant-DNA-technologie bij de vervaardiging van een bestanddeel van een fotografische film. Het bestanddeel van belang is collageen.

15 ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

De werkwijze ter vervaardiging van een film is een complexe procedure waarover veel is beschreven en geoctrooieerd. In algemene termen bestaat de werkwijze voor het bereiden van fotografisch papier
20 en negatieve film uit het bekleden van een aantal lagen op hetzij laminaatpapier, hetzij een negatieve filmdrager. Deze lagen staan bekend als emulsielagen die voor straling gevoelige zilverhalidekristallen als meest essentieel bestanddeel kunnen bevatten of intermediaire lagen zonder deze fotogevoelige
25 bestanddelen. De onderhavige uitvinding is gericht op het verbeteren van de fotogevoelige laag als zodanig en het verbeteren van de vervaardigingswerkwijze van fotografische lagen.

Er zijn drie stadia waarbij gelatine in de filmvervaardigingswerkwijze worden toegepast. De functie van het
30 gelatine verschilt in elk stadium en derhalve zijn de vereiste kenmerken voor elk stadium verschillend en kan worden verwacht dat collageenachtige stoffen specifiek op maat kunnen worden gemaakt om bij elke specifieke toepassing geschikt te zijn.

Veel aandacht is gericht op het proces van bereiding van zilver-
35 halide-emulsies voor fotografische toepassingen. Veel aandacht is besteed aan de rol van korrelmorfologie van zilverhalidekristallen en aspecten die het AgX kernvormingsproces en het daarop volgende rijpingsproces beïnvloeden. Het meest essentiële bestanddeel in een emulsielaag van een fotografische drager bestaat uit voor straling
40 gevoelige zilverbromide-microkristallen die eventueel jodium en/of chloride bevatten waarnaar in het algemeen gerefereerd wordt als zil-

verhalidekorrels. Een peptiseermiddel wordt gedurende de precipitatie van de korrels toegevoegd teneinde ongecontroleerde coalescentie of flocculatie te vermijden. Het inbrengen van het peptiseermiddel kan echter een aantal nadelen vertonen, o.a. het beperken van de vorming van dunne tabulaire korrelemulsies met gemiddelde en hoge aspectratio die op hun beurt nadelen vertonen bij fotografie. Gelatine is in diverse vormen toegepast in fotografische filmprocessen als peptiseermiddel. Het is algemeen bekend dat de tabulaire korrels met een hoge aspectratio diverse fotografische voordelen hebben zoals vergroete scherpte, verbeterde snelheid-korreligheidverhoudingen, toegenomen blauwe en zonder blauwe snelheidsscheiding, snellere ontwikkelbaarheid en een hoger zilverkleurvermogen (Research Disclosure Vol. 225, Jan. 1983, onderwerp 22534; EP-A-0.610.796). Het is eveneens wenselijk geacht tabulaire korrels te produceren niet slechts met een hoge aspectratio maar eveneens met een smalle korrelgrootteverdeling anders uitgedrukt als een wens voor mono- of homodispersiteit.

Tot heden is het gelatine dat in commerciële processen wordt toegepast afgeleid van dierlijke bronnen in het algemeen simpelweg door afleiding uit bot en huid van dieren. De nadelen van dit materiaal zijn de aanwezigheid van onzuiverheden, alsmede het feit dat de aard van het preparaat onduidelijk gedefinieerd is en derhalve niet reproduceerbaar is. Het is onduidelijk welke bestanddelen aanwezig zijn en in welke hoeveelheden. Daarnaast is het evenmin duidelijk welke bestanddelen eigenlijk vereist zijn voor optimale activiteit. De reproduceerbaarheid van het filmvervaardigingsproces is twijfelachtig vanwege het ontbreken van consistentie van het gelatinepreparaat zoals in diverse stadia van het filmvervaardigingsproces wordt toegepast.

De nadelen van gelatine in fotografische toepassingen zijn gedurende jaren in detail aangepakt en zijn het onderwerp geweest van diverse octrooiaanvragen. De meeste van deze documenten zijn gericht op het aanpakken van werkwijzen voor de ontwikkeling van gemodificeerde gelatines na het verkrijgen daarvan uit de dierlijke bron, teneinde specifieke verbeteringen in de karakteristieken van de gemodificeerde gelatines aan te brengen. US-4.439.520 van 1984 beschrijft de wenselijkheid voor aspectratio's van meer dan 8 voor meer dan 50% van de kristallen, aangezien dit de blauwe snelheid zou verbeteren. In 1987 wordt in Amerikaans octrooi 4.713.320 het gebruik van gelatine met een methioninegehalte beneden 30 μmol per gram, bij voorkeur minder dan 5

5 μmol per gram genoemd teneinde dunne trapezoidale hexagonale en drie-
 hoekige tabulaire korrels te verkrijgen. Een normale van bot afgeleide
 gelatine werd toegepast dat was geoxideerd teneinde een methionine-
 gehalte onder $30 \mu\text{mol}$ per gram gelatine te verkrijgen. Het lagere
 10 methioninegehalte wordt eveneens beschreven in US-4.914.014 in 1990
 omdat dit een breder traject van pBr gedurende precipitatieomstandig-
 heden bood. Diverse publicaties hebben betrekking op werkwijzen voor
 het verlagen van het methioninegehalte van gelatine. EP-558.410 die in
 1993 is gepubliceerd beschrijft een oxiderende reagensreactie van
 15 alkalihipochloriet of H_2O_2 evenals artikelen in J. Photo. Sci. 40 230-
 230 (Nippi), J. Photo. Sci 37, 14-18 (AGFA) van 1992 en J. Imag. Sci
 33,1 3-17 van 1989. Zelf zo lang geleden als 1959 werd oxidatie gesug-
 gereerd als een wijze om onzuiverheden te verwijderen.

Er is veel onderzoek uitgevoerd naar collageen en collageenachtig-
 15 ge eiwitten per se onder toepassing van recombinant-nucleïnezuurtech-
 nologie. Het gebruik van recombinant-DNA-technologie in combinatie met
 collageen en de toepassing daarvan in fotografische toepassingen is
 echter opmerkelijk afwezig geweest. De meeste documenten die op het
 gebied van recombinant collageen zijn gepubliceerd zijn gericht ge-
 20 weest op diagnostische toepassingen onder toepassing van PCR-technolo-
 gie op genomisch nucleïnezuur, hetgeen zelfs de expressie van de voor
 collageen coderende sequentie niet vereist. Het slechts aanwezig zijn
 van de sequentie in het genoom voldoet voor diagnose in deze gevallen.
 Wanneer dergelijke documenten daadwerkelijk expressie van voor colla-
 25 geen coderende sequenties beschrijft hebben deze zeker geen vereiste
 van een hoge mate van expressie. Anderzijds waar expressie wordt ge-
 noemd zijn slechts gedeeltes van de coderende sequentie tot expressie
 gebracht, in tegenstelling tot de volledige sequentie. Vaak zijn deze
 gedeeltelijke sequenties toegepast voor het opwekken van antilichamen
 30 waarvoor de hoeveelheden eiwitachtig materiaal die vereist zijn, mini-
 maal zijn. Daarnaast zijn, wanneer eenmaal de antilichamen zijn ver-
 kregen, de sequenties niet verder noodzakelijk voor de farmaceutische
 toepassing. Derhalve is, onder deze omstandigheden, lage expressie
 geen relevant onderwerp. Tevens kan verwacht worden dat de expressie
 35 van kleine gedeeltes van de coderende sequentie de expressieproblemen,
 die worden toegekend aan de hoge mate van herhaling van de coderende
 sequentie, elimineert.

Synthetisch nucleïnezuur is ontwikkeld in een poging expressie-

problemen die samengaan met langere zich herhalende sequenties te voorkomen en tevens in een poging nieuwe eiwittypes, dat wil zeggen synthetisch eiwit, te ontwerpen. Zulke synthetische polypeptiden zijn echter extreem kostbaar om te produceren. Het is derhalve niet doen-
 5 lijk deze in toepassingen te gebruiken waarbij grootschalige productie is vereist, zoals noodzakelijk is in het gebied van fotografische filmproductie.

De toepassingen volgens de stand van de techniek vereisen derhalve hetzij niet de hoge mate van expressie die voor productie op indus-
 10 triële schaal noodzakelijk is, hetzij leveren zij in feite niet het gewenste resultaat. De documenten die deze toepassingstypen hebben, hebben dientengevolge het probleem van verkrijgen van hoge expressie van natieve collageensequenties of sequenties met overeenkomende lengte en structuur niet aangepakt of opgelost.

15 In het algemeen waar de stand van de techniek een suggestie heeft gedaan ten aanzien van het tot expressie brengen van natieve sequenties of gedeelten daarvan zijn algemene termen gebruikt en is verwezen naar handboeken voor algemene transformatieprotocollen zonder verder detail. Waar voorbeelden zijn gegeven zijn *E. coli* of *S. cerevisiae*
 20 als producerend organisme genoemd en is de mate van expressie niet van belang geweest.

Waar expressieproblemen van collageenachtig eiwit zijn aangepakt is dit gebeurd onder toepassing van hetzij gemodificeerde *E. coli*, hetzij hogere diercellen en insectcellen. De laatstgenoemden zijn
 25 eveneens gemodificeerd voor postverwerking. De toepassing van het laatste celtype voorkomt echter grootschalige productie vanwege de hoge kosten van de cellen, de media en de isolatie van het product. Het nadeel van *E. coli* is dat deze het gewenste product niet kan uitscheiden. Het is derhalve niet toepasselijk dergelijke productie-
 30 (micro)organismen toe te passen bij toepassingen die grootschalige productie vereisen zoals vereist is in het gebied van fotografische filmvervaardiging.

Veel onderzoek is gericht geweest op het bereiken van de post-transcriptiemodificatie die vereist is om tot fibrillair collageen te
 35 komen of collageen met een drievoudige helix, hetgeen de toestand is van collageen zoals aanwezig is in dierlijke bronnen, d.w.z. de toestand is van collageen zoals momenteel op industriële schaal bij fotografische toepassingen wordt toegepast. Het is algemeen aanvaard dat

een gastheercel die een postverwerkingsapparaat als zodanig, danwel, door toevoeging van coderende sequenties voor postverwerkingsenzymen, dit bevat, dient te worden toegepast bij het tot expressie brengen van collageenachtig materiaal, teneinde te komen tot collageen met een
 5 drievoudige helix, en meer in het bijzonder fibrillair collageen. Het is algemeen aanvaard dat deze vorm van collageen de bruikbare vorm is voor toepassing.

Waar in de stand van de techniek daadwerkelijk is gesuggereerd dat recombinant collageen kon worden toegepast bij fotografische toe-
 10 passingen is de relevantie van de specifieke vorm van collageen materiaal in het algemeen niet aangepakt vis a vis de vereisten die specifiek zijn voor dergelijke toepassing. Sommige octrooiaanvragen hebben in het voorbijgaan het gebruik van recombinant-collageen voor film genoemd, sommige hebben zelfs specifiek fotografische toepassing ge-
 15 noemd. De leer van zulke documenten is echter duidelijk gericht op andere aspecten en is niet specifiek gericht op fotografische toepassingen en de speciale vereisten daarvan. Geen van de voorbeelden die in dergelijke aanvragen zijn gegeven zijn om diverse redenen zelfs in feite geschikt voor toepassing in fotografische films. De octrooiaan-
 20 vragen worden derhalve geacht niet nawerkbaar te zijn en slechts speculatief van aard te zijn wanneer het erop aankomt recombinant-collageen in fotografische film toe te passen. Voorbeelden van dergelijke documenten worden nu verschaft.

In W090/05177 wordt de vervaardiging van nieuwe polymeren be-
 25 schreven die kleine, zich herhalende sequenties omvatten, in het bijzonder zich herhalende groepen zoals bij zijde worden beschreven. Collageen wordt gesuggereerd als één van de structuren die in staat zijn een zich herhalende eenheid te verschaffen. Er wordt gezegd "de eigenschappen van CLP werden zodanig ontworpen dat zij thermoreversi-
 30 bele gelling bij hoge temperaturen konden ondergaan, alsmede zodanig dat zij non-immunogeen waren. De hoge stabiliteit van de helices zou hoge treksterkte in vezels of membranen die uit CLP werden geformuleerd creëren. Deze keteneigenschappen zouden het scheppen van hydrogeencolloïden in waterige oplossingen mogelijk moeten maken die ver-
 35 volgens op harde substraten bij toepassing zouden kunnen dienen als zachte bekledingen." Vervolgens wordt een suggestie gegeven van een zacht bekledingsmateriaal met een ligand voor een cellulaire receptor. De sequentie GLPGPGKGDRGDAGPKGADGSP zou aan het CLP-monomeer moeten

worden toegevoegd en een voorbeeld van een construct die tot expressie moest worden gebracht vanuit *E. coli* wordt verschaft. Met betrekking tot dit preparaat wordt beschreven "de onderhavige preparaten kunnen toepassing vinden als wondverbanden, hetgeen neovascularisatie mogelijk maakt, oogtoepassingen, als matrices voor kunstmatige organen en dergelijke". De combinatie van CLP met andere repetitieve functionele eenheden waarbij functies worden gecombineerd wordt eveneens gesuggereerd. Er worden geen voorbeelden verschaft van toegepaste sequenties.

De enige voorbeelden die zijn verschaft tonen een via recombinant-technologie geproduceerd synthetisch CLP-polypeptide $[[GAP(GPP)3-]2[GPVGSP]_n$ met N-terminale en C-terminale spacers. De spacers hebben een lengte van 33 aminozuren en 25 aminozuren. Dus is het zich herhalende GPP-gedeelte van het polymeer dat een lengte heeft van 24 aminozuren gescheiden door $33+25+6$ aminozuren. Op deze wijze kon blijkbaar *E. coli* een CLP-eiwit van 760 aminozuren tot expressie brengen, d.w.z. met een molecuulgewicht 63.800. Het celbindende CLP had dezelfde basisstructuur maar de hexameer werd door de celbindingsequentie vervangen die boven is gegeven, hetgeen resulteerde in een aminozuurlengte van 814 aminozuren en een molecuulgewicht van 70.560. Het zich herhalende GXY-motief is kort en wordt gescheiden door lange, zich niet herhalende sequenties. Verondersteld wordt dat dit expressie door *E. coli* mogelijk zal maken. Het spacer-DNA codeert voor twee cysteïne-groepen en eveneens voor drie methioninegroepen.

Het geciteerde document vermeldt in het inleidende gedeelte met betrekking tot collageen "chemisch gehydrolyseerde natuurlijk collageen kan worden gedenatureerd en worden gerenatureerd door verwarming en afkoeling om gelatine te vervaardigen dat kan worden toegepast in fotografische en medische toepassingen onder andere toepassingen. De keteneigenschap van collageen dat voor dit fenomeen verantwoordelijk is, is het vermogen ervan spontaan interketenaggregaten te vormen met een conformatie die wordt aangeduid als een drievoudige helix". Het werd in het bijzonder opgemerkt dat helixstructuur vereist was. De daarop volgende tekst zwijgt over enige fotografische toepassingen en is duidelijk gericht op compleet andere zaken. De daarop volgende tekst zwijgt eveneens over de mate van expressie die door *E. coli* wordt verkregen. De zich herhalende structuur is aanwezig in een dusdanig lage hoeveelheid dat het onwaarschijnlijk is dat het voldoende

collageenachtige activiteit zal behouden om in fotografische toepassingen bruikbaar te zijn. Daarnaast maakt de aanwezigheid van cysteine- en methioninegroepen in de hoeveelheden die daarin worden verschaft, dergelijke structuren ongeschikt voor toepassing in fotografische toepassingen. Derhalve zal een deskundige op het gebied van fotografische toepassingen worden afgeraden de leer van dit document bij fotografische toepassingen toe te passen.

Dezelfde uitvinders als in de vooraf geciteerde octrooiaanvraag beschrijven in W093/10154 collageenachtige eiwitpolymeren met een hoog molecuulgewicht met zich herhalende triadsequenties met een verlaagd prolinegehalte. Er wordt gezegd dat zij tot productie in ééncellige microorganismen bij hoge molecuulgewichten en met een hoge mate van efficiëntie in staat zijn. Zij geven aan "het uniek zijn van het collageen zich herhalende tripeptide is een uitdaging voor recombinant-technologie in het licht van de hoge mate van repetitiviteit van de sequentie en het frequente gebruik van de aminozuren, glycine en proline in de samenstelling. Genen die coderen voor eiwitten met een hoge mate van glycine en proline zijn per definitie samengesteld uit hoge hoeveelheden van de nucleotiden, guanidine en cytidine in aan zichzelf complementaire sequenties. Dus, naarmate men het gen synthetiseert is er een grote gelegenheid voor de strengen lussen te vormen, enkelstrengig DNA uit te knippen, recombinatiegebeurtenissen te laten optreden die in verlies van gensegmenten, alsmede inefficiënte transcriptie en/of translatie kan resulteren. Er bestaat derhalve aanzienlijke interesse in het ontwikkelen van technieken en preparaten die de voordelige eigenschappen van collageen verschaffen, terwijl zij tegelijkertijd stabiele expressie van collageenachtige eiwitten met een hoog molecuulgewicht mogelijk maken." Daarnaast wordt genoemd "de polymeren zullen verder worden gekenmerkt door net zoals collageen helices te verschaffen die in staat zijn tot denaturatie en renaturatie, het vormen van gelen enz." Een molecuulgewicht tussen 30-150 kD wordt gesuggereerd en ten minste 45% in aantal van de aminozuren tussen de glycines zijn proline, ten minste 80% van de triadsequenties heeft glycine als eerste aminozuur, ten minste 40% in aantal van de triadsequenties omvat ten minste één proline. Het voorbeeld toont het gebruik van drie typen zich herhalende GXO coderende sequenties en N-terminale en C-terminale spacersequenties. Dezelfde spacersequenties uit de vorige octrooiaanvraag werden toegepast. De structuur van de

zich herhalende sequenties was
 $[[\text{GAHGPA}(\text{GAPGPAGPP})_{24}(\text{GAHGPA}(\text{GAPGPAGPP})_2)_2]_2 = [[\text{C}]_2[\text{A}]_{24}[\text{C}]_2]_2$. De lengte
 van het vervaardigde polypeptide bedroeg 561 aminozuren met een mole-
 cuulgewicht van 46.409 Dalton. In een ander voorbeeld was de represen-
 5 t a t i e v e s e q u e n t i e
 $[[\text{GAHGPA}(\text{GAPGPAGPP})_{12}(\text{GAHGPA}(\text{GAPGPAGPP})_5)]_5 = [[\text{C}]_2[\text{A}]_{12}[\text{C}]_2]_5$. De lengte
 van het vervaardigde polypeptide was 777 aminozuren met een molecuul-
 gewicht van 64.094 Dalton met een waargenomen eiwitband op 100 kD. In
 het derde voorbeeld was de structuur $[[\text{GAHGPA}(\text{GAPGPAGPPGSRDPGPP})_{12}(\text{GAHGPA}(\text{GAPGPAGPP})_4)]_4 = [[\text{C}]_2[\text{AB}]_{12}[\text{C}]_2]_4$. Het voorbeeld had 1065 aminozuren
 10 en een molecuulgewicht 91,966 met een eiwitband die zichtbaar was bij
 135 kD. Ogenscheinlijk kleinere versies werden eveneens vervaardigd
 met eiwitbandgewichten van 28 kD, 64 en 98 kD. Met betrekking tot ex-
 pressie zijn de enige details die worden verschaft dat detectie met
 15 antisera door middel van Western blot werd uitgevoerd en dat de ex-
 pressie van het polymeer met volledige lengte afnam met gengroo-
 tterwijl de synthese van mRNA met volledige lengte op vergelijkbare
 niveaus bleef. Een andere groep polymeren met twee andere zich herha-
 lende eenheden werd eveneens vervaardigd $[[\text{C}]_2[\text{DB}]_{12}[\text{C}]_2]_4$,
 20 $[[\text{C}]_2[\text{DB}]_6[\text{C}]_2]_4$ en $[[\text{C}]_2[\text{D}]_{24}[\text{C}]_2]_4$, waarbij B en C hetzelfde zijn
 als hierboven en D = GAQGPAGPG. Deze drie eiwitten die respectievelijk
 zijn getoond hadden 1065 aminozuren en MW 91.533 D, 633 aminozuren en
 MW 55.228 D, 1065 aminozuren en MW 85.386 D met een eiwitband die
 zichtbaar was bij 140 kD. Van de voorbeelden is slechts informatie met
 25 betrekking tot de kenmerken van het product gegeven voor nummer 6. Het
 product is extreem oplosbaar in water. Bij kamertemperatuur of daarbo-
 ven zijn oplossingen van meer dan 8% in water viskeus, doch vloeibaar
 en vormen bij afkoelen tot 0°C een vaste gel. Bij verwarming boven
 28°C vormt de gel een dikke oplossing. Een thermoreversibele overgang
 30 tussen vloeistof en gel is dus geïllustreerd. Het laatste voorbeeld
 had betrekking op een structuur $(\text{GAPSQGAPGLQ})_{68}$, eveneens met dezelfde
 spacers en 1077 aminozuren met een molecuulgewicht 91.266 D. Met
 betrekking tot toepassing van dit polypeptide wordt niets meer genoemd
 dan in de vorige geciteerde aanvraag van dezelfde uitvinders. Blijk-
 35 baar door het variëren van de blokcopolymeerstructuur van het zich
 herhalende GXO-motief is het mogelijk geworden expressie van langere,
 zich herhalende sequenties te laten optreden. Hoe efficiënt een derge-
 lijk eiwit tot expressie wordt gebracht is echter niet duidelijk. Er

is geen specifieke leer met betrekking tot fotografische toepassingen gegeven. In het bijzonder gebruiken alle voorbeelden een spacer met cysteine en methionine, hetgeen ongewenst is bij fotografische toepassingen. Derhalve zou een deskundige op het gebied van fotografische
 5 toepassingen worden weggeleid van het toepassen van de leer van dit document bij fotografische toepassingen.

Frans octrooi 2685347 bespreekt de wenselijkheid van het produceren van recombinant materiaal met vergelijkbare eigenschappen als gelatine. Het voordeel zou een meer homogeen product zijn die de re-
 10 produceerbaarheidsproblemen zou oplossen en de mogelijkheid zou bieden chemische functies daarvan te modificeren. Het idee was het bereiden van oligopeptiden als gelatinesubstituten. Het gekozen microorganisme was *E. coli* en er wordt vermeld dat het afwezig zijn van posttranslatie-modificaties zoals glycolisering die kenmerkend zijn voor coli
 15 geen probleem vormt. Eveneens wordt genoemd dat andere gastheren mogelijk zijn. Er worden geen voorbeelden gegeven van dergelijke gastheren. De toe te passen nucleïnezuursequentie dient een voor gelatine-peptide coderende sequentie voor (glyX-Y)_n, gekoppeld aan Met-Cys-His-His-His-Leu-Met codons te omvatten, teneinde selectie te laten plaats-
 20 vinden. De sequentie die bij wijze van voorbeeld wordt gegeven codeert voor Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Lys-Gly-Trp-Met. In een later proefschrift van de uitvinder is duidelijk dat de mate van expressie onvoldoende was voor industriële toepassing van enig soort. Het proces van terugvinden van het geproduceerde aminozuur was ingewikkeld. *E.*
 25 *coli* was de gastheercel met de reeds daarvoor genoemde nadelen bij belangstelling voor productie op industriële schaal. Uiteindelijk werd niets daadwerkelijk geïllustreerd met betrekking tot toepassing van het voorgestelde collageen in een fotografische film. Derhalve zou een deskundige op het gebied van fotografische toepassingen worden wegge-
 30 leid van het toepassen van de leer van dit document bij fotografische toepassingen.

Uiteindelijk is een Amerikaans octrooi verleend aan Kodak in 1990 die betrekking had op specifiek gemodificeerde collageenachtige polypeptiden en de toepassing daarvan voor fotografische doeleinden waarin
 35 wordt beschreven dat collageenachtige peptiseermiddelen met zilverbindingssterkte beneden 50 mV kunnen leiden tot een hoge mate van dunne tabulaire korrel. Dit document laat dit zien voor een aantal synthetisch geproduceerde polypeptiden met een lengte van 25 aminozuren. Dit

document noemt eveneens een polypeptide met een collageenachtige structuur dat zou zijn bereid onder toepassing van recombinant-technologie. Het recombinante polypeptide is een synthetisch polypeptide met een blokcopolymeerstructuur bestaande uit slechts 4 aminozuren. Er worden geen daadwerkelijke expressiedetails gegeven voor dit recombinant-polypeptide, er wordt slechts verwezen naar standaard moleculaire biologie vervaardigingsprotocollen, alsmede het gebruik van *S. cerevisiae* als expressiegastheer. Het molecuulgewicht is bij benadering 26 kDa. Het is derhalve de vraag of een moleculair bioloog die op de hoogte was van de expressieproblemen die in detail in andere documenten van dezelfde datering zijn gegeven, alsmede van een latere datering, serieus een dergelijke vervaardiging zal overwegen. Daarnaast zijn geen details met betrekking tot bindingssterkte van het recombinant geproduceerde product verschaft, zodat het eveneens de vraag is of een deskundige op het gebied van fotografische toepassingen serieus in overweging zou nemen dit product in een zilverhalide-emulsie toe te passen voor fotografische film, of serieus zou verwachten dat het de kenmerken van de korte synthetische polypeptiden die zijn beschreven, zou vertonen. Het document suggereert eveneens dat de specifieke polypeptiden die zijn beschreven histidine, methionine en isoleucine op specifieke punten omvatten, namelijk op Xaa van de volgende formule die hoge bindingssterkte zullen vertonen en geen tabulaire korrelvorming zullen vertonen. De formule van de verbinding is

Gly Pro Xaa1 Gly Leu Xaa2 Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Ala Ser Gly Ala Pro Gly Phe Gln Gly. Analyse van de tabel die details van de verbindingen, die door Kodak zijn onderzocht verschaft laat zien dat alle verbindingen met hoge bindingssterkte ten minste één reducerend aminozuur per 25 aminozuren bevatte, derhalve resulterend in gehalten met meer dan 400 μmol methionine per gram polypeptide. De verbindingen die worden geïllustreerd met lage bindingssterkte en tabulaire korrelvorming omvatten geen reducerende aminozuren Met of His.

BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

35

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op het gebruik van recombinant-DNA-technologie, waardoor nu uiteindelijk productie van grote hoeveelheden in hoofdzaak zuiver collageen materiaal mogelijk

1007908

wordt, waarbij de bovengenoemde moeilijkheden worden overwonnen. Voor de eerste keer is een bereidingsproces van recombinant-collageen uitgevoerd waarbij een hoge mate van expressie wordt verschaft zonder dure media, expressiegastheren of niet uitscheidende expressiegastheren nodig te hebben. Daarnaast is het eveneens mogelijk geworden collageen dat gekozen is en/of is aangepast voor optimale toepassing in elk specifiek stadium van het productieproces van de fotografische film waar gelatine tot dusver is toegepast te produceren. Hierdoor wordt nog verdere verbetering van film mogelijk gemaakt. Een verbeterd filmproductieproces is eveneens nu mogelijk, hetgeen leidt tot een afname in productiekosten.

De onderhavige uitvinders hadden interesse in het verkrijgen van een meer uniform filmmateriaal en besloten de mogelijkheid het produceren van natief collageen te onderzoeken dat identiek was met collageen dat uit dierlijke bronnen werd afgeleid, zoals tegenwoordig in het industriële fotografische filmproductieproces wordt toegepast. Zij verwachtten dat het gebruik van via recombinant-technologie geproduceerd collageen kon leiden tot verbeteringen in de zilverhalide-emulsieproductie vanwege de meer uniforme aard ten opzichte van de natuurlijke bron die een groot aantal contaminanten en een mengsel van collageentypes van niet gedefinieerde en wisselende aard met collageen type 1 als hoofdbestanddeel omvat. Het idee was een stof te gebruiken die zo dicht mogelijk bij het natuurlijke collageen kwam in plaats van synthetisch ontworpen collageenachtige polypeptiden met blokcopolymeerstructuur te gebruiken. Men hoopte dat expressieproblemen voor een sequentie die overeenkwam met de natieve sequentie kleiner zouden zijn dan die welke zijn gevonden bij het synthetisch ontworpen collageenachtig polypeptide, zoals reeds in detail in de stand van de techniek is beschreven.

Echter in tegenstelling tot de natieve situatie voor collageen werd besloten pogingen helixachtige structuren los te laten onder toepassing van de recombinant-technologie. In het licht van pagina 1, WO93/07889 die meldt "tenzij een geschikt aantal y-positie propylgroepen wordt gehydroxyleerd tot 4-hydroxyproline door propyl-4-hydroxylase kunnen de nieuw gesynthetiseerde ketens niet vouwen tot een drievoudige helixconformatie bij 37°C. Indien de hydroxylering niet geschiedt blijven de polypeptiden in een non-helixvorm, worden slecht uitgescheiden door de cellen en kunnen zichzelf niet tot colla-

geenfibrillen assembleren". Het is derhalve verrassend dat onze recombinante sequenties resulteren in expressieproducten die zeer goed worden uitgescheiden door de expressiegastheer. Op basis van dit document konden problemen worden verwacht bij toepassing van uitscheidende cellen, teneinde uitscheiding te bewerkstelligen. Wij hebben eveneens recombinaant-collageen geproduceerd onder omstandigheden, dusdanig dat het de recombinaant-collageenverbinding de fibrilstructuur of de drieduidige helix die kenmerkend is voor natief collageen zoals tegenwoordig bij fotografische toepassingen wordt gebruikt niet kan vormen. Met het oog op dit verschil met het huidige commerciële product was het de vraag of de resulterende recombinaantverbinding even bruikbaar zou zijn voor fotografische toepassing als een helix omvattende verbinding. Daarnaast konden problemen worden verwacht bij de expressie en de afscheiding van een dergelijk expressieproduct. De open structuur kon het expressieproduct extreem kwetsbaar laten voor een aanval door proteasen in de cel.

De resultaten na een aanzienlijke hoeveelheid zware arbeid bij het kloneren van een genomische sequentie voor collageentypes I en III, waarbij expressieproblemen werden overkomen teneinde voldoende hoeveelheden te produceren om testen in fotografische toepassingen te kunnen beginnen waren onverwacht goed. Ten eerste was de mate van expressie onverwacht hoog. Het was hoger dan 0,95 g per liter en bedroeg zelfs meer dan 3 g per liter in totaal. Dit werd totaal onverwacht geacht, allereerst met het oog op alle problemen die in de stand van de techniek waren beschreven. De mate van expressie was zelfs groter dan de productiehoeveelheden die werden bereikt met de gastheer *Pichia pastoris* voor andere eiwitten, waarvan bekend was dat deze niet zo notoir moeilijk in hoge hoeveelheden te produceren waren zoals collageen. Ten lange leste leek het mogelijk een vorm van recombinaant-collageen te produceren in een economisch interessante hoeveelheid met een economische interessante expressiegastheer. Het feit dat productie op grote schaal mogelijk was maakte uiteindelijk het daadwerkelijk uitvoeren van testen op het gebied van fotografische toepassing uitvoerbaar. Testen voor fotografische toepassingen werden slechts mogelijk gemaakt nadat voldoende recombinaant collageen kon worden geproduceerd in betrekkelijk grote hoeveelheden, hetgeen in contrast staat ten opzichte van de kleine hoeveelheden die vereist zijn voor de farmaceutische toepassingen. Na het uitvoeren van deze testen werd ont-

dekt dat tabulaire korrelvorming hoog was (zie tabel 1).

Voor het eerst werd de toepassing van in hoofdzaak zuiver collageen type III in een fotografische emulsie als peptiseermiddel toegepast. De resultaten waren uitstekend. Volkomen onverwacht vonden wij
 5 een mate van tabulaire korrelgrootte hoger dan 95%. Dit was zelfs beter dan de prestaties van het Kodak-polypeptide met polypeptiden met een lage bindingssterkte en dit werd zeer verrassend geacht met het oog op het feit dat een bindingssterkte van 69,5 mV werd gevonden voor dit product en in lijn met de Kodak leer werd daarvoor geen tabulaire
 10 korrelvorming verwacht. Derhalve werd de theorie die door Kodak is gesteld met betrekking tot de vereisten van de bindingssterkte beneden 50 mV, teneinde 80% tabulaire korrelvorming te krijgen omver geworpen. Aldus werd de route geopend een aantal peptiseermiddelen te ontwikkelen met zilverbindingssterkten hoger dan die, die in de stand van de
 15 techniek zijn genoemd als zijnde geschikt voor toepassing in zilverhalide-emulsies die tabulaire korrels in een hoeveelheid van meer dan 80% vereisen. De route werd eveneens geopend om andere typen collageen dan type I als voornaamste collageenbestanddeel van peptiseermiddel in fotografische emulsies toe te passen. Aangezien de mate van homologie
 20 tussen de diverse natieve collagenen 40 tot 50% bedraagt kan men goede resultaten van eveneens in kleine mate gemanipuleerde natieve sequenties verwachten. Een aminozuursequentie die meer dan 50% homologie vertoont met een natieve collageenaminozuursequentie kan derhalve verwacht worden goede resultaten te verschaffen. Mutaties van natieve
 25 sequenties kunnen inserties, deleties en substituties vis a vis de natieve sequentie omvatten. De sequenties die bruikbaar zijn volgens de uitvinding moeten echter een minimale mate van variabiliteit handhaven, teneinde expressieproblemen van de daarvoor coderende nucleïnezuursequenties te voorkomen. Derhalve dienen de mutaties altijd in een
 30 aminozuursequentie met meer dan vier verschillende aminozuren te resulteren. Het GXY-motief dient niet de vorm van een blokcopolymeër te hebben en dient evenmin spacersequenties te omvatten tussen een aantal GXY-motieven. Bij voorkeur zijn meer dan 8, zelfs meer dan 9 verschillende aminozuren aanwezig. In het voorbeeld wordt een eiwit toegepast
 35 met 19 verschillende aminozuren. Er zijn slechts 20 aminozuren die in de natuur voorkomen. Geschikt kunnen 10-20 aminozuren of 10-19 aminozuren worden toegepast (bij voorkeur wordt echter cysteine vermeden).

De uitvinding omvat derhalve een dunne tabulaire zilverhalide-

emulsie waarbij de tabulaire korrels meer dan 75% uitmaken van het totale korrel geprojecteerde oppervlak van de emulsie die zilverhalide-korrels omvat die bij aanwezigheid van een peptiseermiddel een kern hebben gevormd en daarna bij aanwezigheid van peptiseermiddel zijn gegroeid waarbij het peptiseermiddel in hoofdzaak zuiver collageen-achtig materiaal is dat is bereid door genetische manipulatie van voor-
 5 natief collageen coderend nucleïnezuur, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die meer dan 4 verschillende aminozuren omvat. Een dergelijke emulsie kan op geschikte wijze een peptiseermiddel
 10 omvatten met een aminozuursequentie die meer dan 50% homologie vertoont met natief collageen, bij voorkeur meer dan 60%. De emulsie kan peptiseermiddel omvatten met een aminozuursequentie equivalent aan die welke in de natuur voorkomt voor collageen, waarbij "equivalent" impliceert een aminozuuridentiteit van ten minste 80%, bij voorkeur ten
 15 minste 90%, met meer voorkeur voor een aminozuursequentie die dezelfde is als die welke in de natuur voorkomt. De emulsie kan een peptiseermiddel omvatten met een aminozuursequentie die in hoofdzaak dezelfde is als die welke in de natuur voorkomt, waarbij "in hoofdzaak" impliceert mutatie van minder dan 5 aminozuren, bij voorkeur minder dan 3.
 20 Geschikte collageentypes zijn I, II en III. Een voorkeur bestaat voor sequenties die zo dicht mogelijk bij de natieve sequentie zijn, ten einde activiteit te garanderen en expressieproblemen te vermijden. Een collageen type III aminozuursequentie volgens de uitvinding omvat op geschikte wijze of heeft de sequentie van figuur 3. Een collageen-
 25 type-I-aminozuursequentie volgens de uitvinding omvat of heeft de sequentie van figuur 18 of 12. Collageentype III heeft de aminozuursequentie die in referentie 5 van voorbeeld 1 is gedefinieerd en is hierin door verwijzing opgenomen. Een emulsie volgens de uitvinding waarbij het peptiseermiddel aanwezig is in in hoofdzaak zuivere vorm
 30 betekent dat het peptiseermiddel in hoofdzaak vrij is van nucleïnezuur, polysachariden en ander eiwit. De voorbeelden illustreren dat dat inderdaad mogelijk is. De aanwezigheid van suikers en nucleïnezuur in zelfs spoorhoeveelheden kan desastreuze effecten hebben op kristalvorming en het was de vraag of afdoende zuiver recombinant-materiaal
 35 voor de specifieke fotografische toepassing kon worden geproduceerd. De mate van verontreiniging met eiwit moet lager zijn dan met commerciële producten.

Het is voordelig bij toepassing van *Pichia pastoris* als expres-

siegastheer een nucleïnezuursequentie te gebruiken die codeert voor een aminozuursequentie die vrij is van de sequentie MGPR, hoewel dit in de natieve sequentie van collageen-type-I aanwezig is omdat wij onverwacht hebben gevonden dat deze sequentie een nieuwe herkennings-
 5 sequentie is van een protease die zich in *Pichia pastoris* bevindt.

Het peptiseermiddel hoeft niet identiek te zijn met de natieve sequentie maar kan een fragment met gedefinieerde lengte en samenstelling zijn die is afgeleid van een voor natief collageen coderende sequentie, welk fragment het GXY-motief omvat dat kenmerkend is voor
 10 collageen, welke lengte zodanig is dat het fragment op aminozuurbasis gewicht ten minste 2,5 kDa bedraagt. Geschikte gewichten kunnen liggen tussen 2,5 en 100 kDa. Fragmenten van diverse grootte zijn geschikt. 5-50 kDa, zelfs 20-50 kDa zijn geschikte uitvoeringsvormen die kunnen worden toegepast.

15 Diverse manieren zijn beschikbaar om de afwezigheid van helix-structuur te verzekeren. Bijvoorbeeld door te verzekeren dat het peptiseermiddel vrij is van hydroxyproline en/of vrij is van procollageen en telopeptiden. Bij voorkeur dient voor fotografische toepassingen het peptiseermiddel vrij te zijn van cysteïne. Een emulsie volgens de
 20 uitvinding waarin het peptiseermiddel niet gedeamineerd is, is een interessante verdere uitvoeringsvorm van de uitvinding evenals een peptiseermiddel met een isoelektrisch punt van 7-10.

Verder onderzoek werd uitgevoerd teneinde te bepalen wat verder kon worden ontdekt teneinde te definiëren welke andere parameters
 25 konden worden toegepast om de resultaten te verbeteren. Teneinde dit te bewerkstelligen werd een aantal gemodificeerde collagenen geanalyseerd, dat wil zeggen, niet recombinant geproduceerde collagenen met onze recombinant-collagenen in testen teneinde relevante parameters te bepalen. Wij definieerden vervolgens diverse categorieën verbindingen
 30 die geschikt zijn voor het produceren van zilverhalide-emulsies met de vereiste mate van tabulaire korrelvorming.

Een emulsie volgens de uitvinding in één van de andere uitvoeringsvormen die reeds boven zijn genoemd met het peptiseermiddel die verder geoxideerde reducerende aminozuren omvat, d.w.z. in een mate
 35 zodanig dat reducerende aminozuren aanwezig zijn in een hoeveelheid equivalent aan een reducerende sterkte van tussen 0,1 en 200 μmol methionine per gram van het peptiseermiddel, is een geschikte uitvoeringsvorm. Een lagere mate reducerend vermogen verdient de voorkeur

- zodat voorkeurseemulsies volgens de uitvinding peptiseermiddel zullen omvatten die geoxideerde reducerende aminozuren omvatten in een mate, zodanig dat reducerende aminozuren aanwezig zijn in een hoeveelheid equivalent met een reducerend vermogen van tussen 0,1-80 μmol methionine per gram van het peptiseermiddel. Redelijk hoge hoeveelheden geoxideerde reducerende aminozuren in een mate zodanig dat reducerende aminozuren aanwezig zijn in een hoeveelheid, equivalent aan een reducerend vermogen van tussen 30-80 μmol methionine per gram van het peptiseermiddel zijn eveneens in staat afdoende resultaat te geven.
- 10 Dit is redelijk verrassend gezien de eerdere leer met betrekking tot de vereisten voor lage waarden van reducerend vermogen voor tabulaire korrelvorming van diverse publicaties uit de stand van de techniek. De uitvinding dekt eveneens zulk gemodificeerd collageen met hogere hoeveelheden methionine dan 80 μmol , bijvoorbeeld gemodificeerd type I.
- 15 De modificatie bijvoorbeeld van type I collageen hoeft niet per se door oxidatie plaats te vinden maar kan eveneens het resultaat zijn van mutatie van de coderende sequentie, zodanig dat reducerende aminozuren worden vervangen tot de vereiste mate door niet reducerende aminozuren. Dit betekent dat een chemische behandelingsstap van het collageen voorafgaand aan toepassing in zilverhalide-emulsie kan worden overgeslagen met de daarbij behorende voordelen qua tijd en kosten voor het productieproces. Uiteraard kan men een natief collageen toepassen dat niet meer dan 80 μmol reducerend aminozuur bevat, bijvoorbeeld collageen type III.
- 25 Daarnaast hebben wij in tegenstelling tot de leer van Kodak die eerder is genoemd en in 1990 is gepubliceerd ontdekt dat een emulsie volgens de uitvinding in één van de andere uitvoeringsvormen die is genoemd, die een peptiseermiddel omvat met een bindingssterkte voor zilver die hoger is dan 50 mV uitermate goed kan functioneren als een emulsie met een hoge mate van tabulaire korrelvorming. Een geschikt
- 30 peptiseermiddel zal een bindingssterkte hebben voor zilver beneden 100 mV. In tegenstelling tot de leer van de stand van de techniek kan het peptiseermiddel een bindingssterkte voor zilver hebben tussen 50-100 mV en een emulsie verschaffen met uitstekende tabulaire korrelpercentages.
- 35 De zilverhalide-emulsie die resulteert uit toepassing van dergelijk collageenachtig materiaal zal op geschikte wijze meer dan 80% tabulaire korrels vertonen, bij voorkeur meer dan 90%. De meeste voor-

keur verdient een tabulair korrelpercentage hoger dan 95%. De korrels zullen een gemiddelde aspectratio hoger dan 3 vertonen bij bepaling onder toepassing van de afzonderlijke jet-methode onder de reactieomstandigheden zoals in die in het voorbeeld zijn beschreven. Opge-
merkt wordt dat deze reactieomstandigheden nietde geoptimaliseerde
reactieomstandigheden zijn die in daadwerkelijke filmproductieproce-
sen worden toegepast ter verkrijging van de hoge aspectratio's doch
slechts een indicatie verschaffen of het materiaal geschikt is om hoge
aspectratio's te verkrijgen wanneer dergelijke geoptimaliseerde om-
standigheden worden toegepast. In het algemeen kunnen aspectratio's
hoger dan 5 worden verwacht onder toepassing van de methode. De ver-
bindingen volgens de uitvinding bij toepassing van geoptimaliseerde
omstandigheden die tegenwoordig worden gebruikt op normaal collageen,
bijvoorbeeld onder toepassing van de dubbele jet-methode worden ver-
wacht veel hogere aspectratio's te vertonen. Een andere factor die de
mate van aspectratio kan vergroten is de toevoeging van meer zilver
dan in ons voorbeeld is gebruikt. De test die is toegepast geeft
slechts een snelle indicatie van hoge aspectratiovormingscapaciteit en
de deskundige zal zich realiseren welke maatregelen kunnen worden
genomen teneinde het resultaat verder te verbeteren.

In onze test wordt het rijpingsproces uitgevoerd zonder enige
verdere toevoeging van peptiseermiddel of additioneel zilver. Duide-
lijk zal zijn dat in een proces volgens de uitvinding de rijpingsstap
eventueel een dergelijke verdere toevoeging kan omvatten. Bij voorkeur
zal het peptiseermiddel hetzelfde materiaal zijn voor zowel nucleatie-
als rijpingsstap. Een additionele toevoeging in de rijpingsstap zou
voordelig kunnen zijn vanwege een vergrote sterische stabiliteit in
dit stadium.

Een voorkeurseemulsie volgens de uitvinding omvat een peptiseer-
middel dat stabiel is ten opzichte van tabulaire zilverhalide-korrel-
vorming bij een pH tussen 4-8. Conventioneel gelatine dat is afgeleid
van alkalisch bot en gehydrolyseerde gelatine vertonen niet zulke
goede tabulaire korrelvormingsresultaten bij een pH hoger dan 5,5. De
peptiseermiddelen volgens de uitvinding, bijvoorbeeld natief recomb-
inant collageen III en natief recombinant collageen type I vertonen een
dergelijk kenmerk waardoor de vereiste voor strenge pH-controle gedu-
rende emulsieproductie, opslag en toepassing overbodig wordt. Een
emulsie volgens de uitvinding kan derhalve een pH hebben tussen 4-8

zonder negatief de tabulaire korrelvorming te beïnvloeden. Bij het proces van emulsiebereiding zal een variatie in pH niet op negatieve wijze de uitkomst beïnvloeden bij verdere verwerking van de resulterende emulsie voor fotografische elementproductie.

- 5 Een emulsie volgens de uitvinding biedt het voordeel boven conventioneel collageen omvattende zilverhalide-emulsies, dat het peptiseermiddel een homodisperse aard heeft. Het kristallisatieproces zal vanwege dit feit eveneens meer homogeen zijn met alle voordelen die hierboven zijn genoemd. Het is mogelijk op diverse stadia van de nucleatie en groei van de zilverhalide kristallen een verder homogeen peptiseermiddel toe te voegen dat eveneens duidelijk gedefinieerd is en in hoofdzaak zuiver is waardoor kosteffectiviteit en het regelen van kristallisatie-eigenschappen in een geregelde wijze die voorheen niet mogelijk was, met een collageenachtig peptiseermiddel mogelijk
- 10 maakt. Aangezien er diverse collageentypes zijn kunnen deze uiteraard worden toegepast in fotografische zilverhalide-emulsies volgens de uitvinding.

- Er zijn tot dusver 23 collageengenen die zijn ontdekt. De meeste hiervan zijn gedeeltelijk of geheel gesequenced. De databanken omvatten de diverse sequenties daarvan. Genbank bijvoorbeeld heeft de coli-sequentie onder toegangsnummer U08020 en de colIII-sequentie wordt gegeven in referentie 5 van voorbeeld 1. Deze natieve collageengenen vertonen homologieën bij onderlinge vergelijking van 40-50%. De relevante informatie van de geciteerde literatuurplaatsen met betrekking tot sequentiedata is hierbij opgenomen door verwijzing, zie bijvoorbeeld eveneens W095/31473, pagina 5. Toepassing van één van deze natieve sequenties als zodanig of gemodificeerd teneinde een collageenachtige verbinding zoals hierboven is gedefinieerd volgens de uitvinding te vervaardigen waarbij de verbinding vervolgens wordt toegepast
- 25 in een zilverhalide-emulsie voor fotografische toepassing wordt gedekt door de onderhavige uitvinding. Op geschikte wijze kunnen de natieve sequenties worden toegepast, dat wil zeggen sequenties die coderen voor polypeptiden met de natuurlijke aminozuursequenties zolang het gecodeerde polypeptide binnen de hierboven beschreven parameters valt.
- 30 Het type I is het type dat het meest veelvuldig is toegepast in zilverhalide-emulsies, aangezien de bron voor zilverhalide-emulsiegelatine dierlijke botten was waarvan type I collageen het meest voornamelijk aanwezige collageentype is. Nu is het echter mogelijk geworden

eveneens andere collageentypes te testen voor hun geschiktheid en toe te passen in zilverhalide-emulsies. De andere collageentypes zijn niet als zodanig in de stand van de techniek in de fotografische toepassingen gebruikt en zeker niet als zodanig in zilverhalide-emulsies.

5 Uiteraard is een aantal ervan in dierlijk weefsel dat tot dusver is toegepast aanwezig geweest. Echter is het nu mogelijk geworden om te kijken of deze collageentypes inderdaad verantwoordelijk kunnen zijn voor of kunnen bijdragen aan nog meer gunstige eigenschappen voor fotografische film die voorheen niet waren herkend. Een fotografische

10 film die collageenachtig recombinant-polypeptide anders dan type I als collageenachtig bestanddeel omvat wordt eveneens geacht een geschikte uitvoeringsvorm van de uitvinding te zijn zo lang als aan de specifieke vereisten die hierboven uiteen zijn gezet wordt voldaan. Specifieke toepassing in een zilverhalide-emulsie wordt gedekt. In het geval van

15 zilverhalide-emulsies verwacht men dat een 100% uniforme bron van collageen maximale homodispersietijd van kristalvorming zal verschaffen. De vereisten van homodispersieteit en de waarde daarvan zijn elders in de beschrijving van de uitvinding besproken.

Naast de hierboven genoemde emulsies heeft de uitvinding eveneens

20 betrekking op een werkwijze voor het bereiden van dunne tabulaire zilverhalide-emulsies waarbij de tabulaire korrels meer dan 75% van het totale korrel geprojecteerde oppervlak in beslag nemen, welke werkwijze het vormen van de kern van zilverhalide korrels bij aanwezigheid van peptiseermiddel en het daarna groeien van de zilverhalide

25 korrels bij aanwezigheid van peptiseermiddel omvat, waarbij beide peptiseermiddelen aanwezig zijn in een gedefinieerde hoeveelheid en beide peptiseermiddelen collageenachtig materiaal zijn dat is bereid door genetische manipulatie van voor natief collageen coderend nucleïnezuur welke peptiseermiddelen een aminozuursequentie hebben die

30 meer dan vier verschillende aminozuren omvat. Een dergelijke werkwijze volgens de uitvinding kan toevoeging van het peptiseermiddel in de nucleatiestap en/of gedurende de korrelgroeistap omvatten, welk peptiseermiddel kan worden gekozen uit één van de uitvoeringsvormen die hierboven of in de conclusies is beschreven. In een bijzondere uitvoe-

35 ringsvorm omvat de werkwijze toevoeging van het peptiseermiddel zowel in de nucleatiestap als gedurende de korrelgroeistap. Het peptiseermiddel dat dient te worden gebruikt wanneer beide stappen worden genomen kan hetzelfde zijn of verschillend, afhankelijk van de omstandig-

heden van het geval.

Na het bereiden van een emulsie volgens de uitvinding kan de emulsie de standaardprocedures ondergaan voor het bereiden van een fotografisch element. De emulsie kan bijvoorbeeld worden behandeld ter
 5 verwijdering van het peptiseermiddel en de resulterende emulsie kan in een op zich bekende wijze worden toegepast voor het bereiken van een zilverhalide-emulsielaag op fotografisch materiaal waarbij de zilverhalide-kristallen van de lagen aspectratio van 5 of meer hebben. Het fotografische element is op geschikte wijze een materiaal dat gevoelig
 10 is voor licht, laser of röntgenstraling, welk element wordt gekozen uit zwart-wit-positieve film, zwart-wit-negatieve film, kleur-negatieve film, kleur-positieve film, digitale film, zwart-wit-positief papier, zwart-wit-negatief papier, kleur-negatief papier, kleur-positief papier, digitaal papier. Een fotografisch element verkregen volgens
 15 een dergelijk proces wordt eveneens gedekt door de uitvinding.

Een ander aspect van de uitvinding is gelegen in een werkwijze voor het bereiden van collageenachtig recombinant-polypeptide die expressie van een voor een collageenachtige polypeptide coderende nucleïnezuursequentie door een microorganisme in een hoeveelheid,
 20 groter dan 0,95 g/L omvat, welk recombinant-collageen vrij is van helixstructuur. Bij voorkeur geschiedt de expressie in een microorganisme anders dan *E. coli* of *S. cerevisiae* ten einde hoge mate van expressie, en bij voorkeur uitscheiding te verzekeren. De werkwijze kan op geschikte wijze worden uitgevoerd met een gistcel. Bij voorkeur
 25 is het microorganisme vrij van actief postverwerkingsmechanisme voor het verwerken van collageenachtige sequenties tot fibrillen waarbij afwezigheid van helixstructuur in het expressieproduct wordt verzekerd. Eveneens kan een dergelijk proces optreden wanneer het microorganisme vrij is van actief postverwerkingsmechanisme voor het ver-
 30 werken van collageenachtige sequenties tot drievoudige helices en/of wanneer de tot expressie te brengen nucleïnezuursequentie vrij is van voor procollageen en telopeptide coderende sequenties. Een voorkeurswerkwijze volgens de uitvinding omvat het gebruik van het microorganisme *P. pastoris* als expressiegastheer.

35 Teneinde productie van een niet gesplitste sequentie te verzekeren omvat een werkwijze volgens de uitvinding voor bereiden van collageenachtig recombinant-materiaal het gebruik van een nucleïnezuursequentie die voor recombinant-collageen-aminozuursequentie codeert,

vrij van protease-splitsingsplaatsen van een protease die in de expressiegastheercel actief is. De werkwijze verschaft op geschikte wijze expressie die leidt tot peptideoogst groter dan 3 g/L. De werkwijze kan op geschikte wijze worden uitgevoerd met één van de collageenachtige recombinant-peptiseermiddelen zoals hierboven voor de emulsie volgens de uitvinding is gedefinieerd. Meer geschikt wordt het product resulterend uit microbiële expressie geïsoleerd en gezuiverd tot het in hoofdzaak vrij is van ander eiwit, polysachariden en nucleïnezuur. Zoals blijkt uit de voorbeelden zijn diverse werkwijzen voor de deskundige beschikbaar teneinde dit te bewerkstelligen. De werkwijze volgens de uitvinding kan het expressieproduct in geïsoleerde en gezuiverde vorm in tenminste de volgende mate verschaffen: een gehalte aan nucleïnezuur minder dan 100 ppm, gehalte aan polysacharide minder dan 5% , gehalte aan ander eiwit minder dan in commerciële producten. DNA-gehalte minder dan 1 ppm, RNA-gehalte van minder dan 10 ppm zelfs minder dan 5 ppm en een polysacharidegehalte van minder dan 1% kan worden verkregen.

Een ander aspect van de uitvinding heeft betrekking op nieuwe collageenachtige recombinant-peptiden. In het bijzonder dekt de uitvinding een in hoofdzaak zuiver collageenachtig materiaal dat is bereid door genetische manipulatie van voor natief collageen coderend nucleïnezuur, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie met meer dan 40% homologie met natief collageen vertoont en meer dan vier verschillende aminozuurtypes omvat. Andere geschikte uitvoeringsvormen zijn de peptiseermiddelen die beschreven zijn in de uitvoeringsvormen van de emulsie volgens de uitvinding. Een homologie zo dicht mogelijk verdient de voorkeur, homologieën van meer dan 50% bij voorkeur zelfs in de orde van 80 tot 100% zijn gewenst. Wij wijzen specifiek op het feit dat de producten bij voorkeur vrij zijn van blokcopolymeerstructuur binnen de GXY-motiefsequentie.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding omvat het collageenachtige materiaal geen cysteïnegroepen. De aanwezigheid van cysteïne in fotografische film zal het filmmaakproces verstoren. Het verdient aldus de voorkeur dat cysteïne in een zo klein mogelijke hoeveelheid aanwezig is. Bij voorkeur zijn geen S-bevattende groepen in de collageenachtige structuur aanwezig. Dit kan worden bereikt, hetzij door chemische modificatie van het recombinante product, danwel door mutatie in de nucleïnezuursequentie die voor het product codeert

of door mutatie of deletie van een voor cysteïne coderende sequentie zodanig dat cysteïne niet langer meer daardoor wordt gecodeerd. Geschikt zullen fotografische toepassingen materiaal gebruiken met minder dan 0,1% cysteïne.

- 5 In het bijzonder is voor optimale zilverhalide-emulsie homogeniteit van het collageen materiaal van uiterste belang. Het is niet slechts een kwestie van afwezigheid van onzuiverheden die een verbetering verschaft, het is eveneens de mogelijkheid moleculen te verschaffen met exact dezelfde samenstelling en lengte die goede regeling van
- 10 het extreem gevoelige proces van kristallisatie mogelijk maakt en eveneens meer uniforme kristalgroei mogelijk maakt. Om deze reden zal collageenachtig recombinant-materiaal van onschatbare waarde zijn voor dit gedeelte van het filmproces. Daarnaast is de afwezigheid van fibrilvorming en zelfs van drievoudige helices vereist voor deze speci-
- 15 fieke toepassing in het filmmaakproces, een aspect dat tot dusver volledig over het hoofd was gezien. Het inzicht in de relevantie van het aantal reducerende groepen in het fotografische materiaal is eveneens van groot belang. Dit is niet de strenge lage hoeveelheid die in de stand van de techniek wordt gesuggereerd als vereist voor tabulaire
- 20 korrelvorming. Derhalve vormt de afname in cysteïne en methioninegehalte in het collageenachtige materiaal dat wordt toegepast een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding.

- De verbindingen volgens de uitvinding hebben eveneens een additioneel voordeel onthuld. De bekende collageen-materialen, d.w.z. regu-
- 25 lier en gehydrolyseerd collageen van dierlijke bronnen zoals bot en huid resulteren in lage tabulaire korrelvorming van de fotografische filmemulsie bij een hogere pH dan 5,5. Van de nieuwe groep recombinant-collagenen is eveneens gevonden dat deze resulteren in dezelfde verrassend hoge mate van tabulaire korrelvorming niet slechts bij pH
- 30 5,5 maar ook bij hogere pH, bijvoorbeeld pH 7. Dit biedt de mogelijkheid zilverhalide-emulsies te bereiden die een minder streng geregelde pH hebben aangezien de nieuwe verbindingen blijkbaar minder pH afhankelijk zijn dan de niet recombinant collagenen. Derhalve is de uitvinding eveneens gericht op collageenachtige recombinant-verbindingen die
- 35 kunnen worden toegepast bij de bereiding van zilverhalide-emulsies bij een pH tussen 4-8 terwijl zij nog uitkomen op hoge tabulaire korrelpercentages i.c. hoger dan 50%, bij voorkeur hoger dan 80%. Een additioneel kenmerk van de recombinant- collagenen die bruikbaar geacht

kan worden is het feit dat de isoelektrische punten basisch zijn, in tegenstelling tot het Kodak-recombinant-polypeptide dat in 1990 is beschreven dat een zuur IEP heeft. Verwacht wordt dat het feit dat het recombinant-collageen volgens de uitvinding een aminozuursamenstelling heeft waarin meer dan 4 aminozuren aanwezig zijn een vergrote variabiliteit biedt in de coderende sequentie en derhalve een hogere mate van expressie toestaat. Additionele variëteit wordt ingebracht door het gebruik van een sequentie met een GXY-motief van minder dan 33% proline in de totale GXY-sequentie. De goede expressie wordt bereikt zonder toepassing van een blokcopolymeeraminozuurstructuur in de GXY-sequentie. De uitvinding zal verder worden geïllustreerd door de voorbeelden.

VOORBEELDEN

15 Voorbeeld 1

Gelatinen, collageen of collageenfragmenten die tot expressie worden gebracht als heteroloog recombinant-eiwit in expressiegastheerorganismen zoals gist, schimmels en bacteriën voor fotografische toepassingen door middel van recombinant-DNA-technieken hebben diverse voordelen. (i) In tegenstelling tot bijvoorbeeld traditionele gelatinen kunnen recombinant-moleculen als rigoureus niet-verknoopt worden geproduceerd. (ii) De moleculaire samenstelling is precies gedefinieerd. (iii) De geproduceerde moleculen zijn van een enkel type (of een goed gedefinieerd mengsel van slechts een paar moleculen), met kleine of verwaarloosbare verontreiniging van andere eiwitachtige of niet eiwitachtige moleculen. De molecuulgewichtverdeling is zeer smal en monodispers (afzonderlijke component gelatinen) of oligodispers. (iv) Het product kan in een zeer reproduceerbare wijze worden vervaardigd, d.w.z. met constante kwaliteit. In het bijzonder zijn gisten goed geschikte productie-organismen voor dergelijke polypeptiden met een zeer hoog repetitieve glycine- en prolinerijke sequentie. (a) Hoewel deze moleculaire kenmerken vaak genetische instabiliteit (bijvoorbeeld recombinatie en verschuiving van delen van het gen) in bacteriële systemen veroorzaakt blijkt dit bij gist niet zo'n probleem te geven [1,2]. (b) dit zijn eukaryote cellen waarbij post-translatie modificaties zoals hydroxylering kunnen worden teweeg gebracht en die de mogelijkheid geven te kiezen voor hetzij efficiënte uitscheiding danwel intracellulaire expressie. (c) Diverse species groeien effi-

ciënt op goedkope substraten zoals methanol, in tegenstelling tot dierlijke celkweken. (d) Afgescheiden productie laat efficiënte winst van het product gedurende of na fermentatie toe (in tegenstelling tot planten). (e) Diverse sterk en strak gereguleerde induceerbare promotoren zijn beschikbaar voor gistsystemen, hetgeen een zeer efficiënte expressie mogelijk maakt en mogelijke negatieve effecten op de viabiliteit en groei van de gastheercellen minimaliseert. Als één van de diverse goed geschikte systemen die beschikbaar zijn is gekozen voor de uitgescheiden productie door de methylotrofe *Pichia pastoris*. Onze expressiehoeveelheden zijn één van de hoogste die ooit zijn beschreven voor recombinant eiwitten hetgeen aanduidt dat deze expressiegastheer het vermogen heeft met de hiervoor genoemde gelatine/collageen om te gaan bij de genetische (DNA-, RNA- en eiwithoeveelheden. Na transformatie van de gastheer wordt het geïntegreerde product opgenomen in het genoom van de gist, resulterend in genetische stabiliteit van de transformanten (verlies van plasmiden is daarna niet van belang). Het is mogelijk transformanten te genereren (waarbij het heterologe doelgen geregeld wordt door bijvoorbeeld de alcoholoxidase (AOX) promoter), waarbij het recombinantgen hetzij in het *HIS4* locus dan wel in het *AOX1* locus wordt opgenomen. In het laatste geval afhankelijk van het integratietype wordt het *AOX1*-gen verstoord, hetgeen leidt tot langzame opname van (en langzame groei op) methanol (*Mut^s* fenotype). Als het functionele *AOX1*-gen nog aanwezig is, is het fenotype *Mut⁺*. Hoewel beide fenotypen kunnen worden toegepast gaat onze voorkeur in het algemeen uit naar snelle groei en werden onze protocollen derhalve in hoofdzaak gericht op de generatie en selectie van *Mut⁺* transformanten. Het is vanzelfsprekend dat gist- of schimmelexpressiesystemen anders dan het *P. pastoris* expressiesysteem in principe even goed zouden kunnen worden toegepast voor de efficiënte productie van recombinante gelatinen, afhankelijk van het exacte type en de kwaliteit van het te produceren molecuul, afhankelijk van de productieschaal die voor ogen staat en afhankelijk van de productiekosten en toepasbare marktprijzen. Het *Pichia*-systeem werd als snel en efficiënt systeem voor pilot-productie toegepast en vanwege betrekkelijk gemakkelijke productwinst.

35

MATERIALEN, METHODEN EN ANALYSES

1007908

Algemeen moleculair-biologische technieken

Kloneringsprocedures werden uitgevoerd in hoofdzaak volgens Maniatis et al. [3]. DNA werd geïsoleerd onder toepassing van Wizard Plus SV miniprep, of Qiagen midiprep systemen. DNA werd uit
 5 agarosegelen geïsoleerd onder toepassing van de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Alle toegepaste enzymen waren van Pharmacia tenzij anders vermeld is en werden toegepast volgens de instructies van de fabrikant. Transformatie van *E. coli* werd uitgevoerd door middel van standaard elektroporatie onder toepassing van de BioRad
 10 GenePulser inrichting. Alle voorschriften met betrekking tot behandeling en transformatie van *Pichia pastoris* en de expressie van eiwitten in dit gastheerorganisme werden in hoofdzaak uitgevoerd volgens het handboek van de *Pichia* Expression Kit (van Invitrogen) [4].

15

Invoeging van een rat-COL3A1-cDNA-fragment in een gist (*Pichia pastoris*) expressievector.

Plasmide pRGR5, die een gedeeltelijke rat-pro α 1(III) collageen-cDNA bevat was een geschenk van Dr. Vuorio [5]. Dit plasmide werd aan
 20 digestie onderworpen met PstI, hetgeen een opbrengst gaf van ongeveer 0,7 kB fragment van het helixdomein. Onder toepassing van de 3'-5'-exonuclease activiteit van T⁴-DNA-polymerase werd het fragment stomp gemaakt en vervolgens geligeerd met T⁴-DNA-ligase en met SnaBI aan digestie onderworpen en met CIP gedefosforyleerde pPIC9 *Pichia*
 25 *pastoris* expressievector geligeerd (Invitrogen). De ligatiereactie werd daarna toegepast voor transformeren van *E. coli* JM 109.

Het dient begrepen te worden dat de keuze van mogelijke en geschikte vectoren niet beperkt is tot pPIC9. Een deskundige op dit gebied zal een aantal andere mogelijke vectoren zoals pHIL-S1 kunnen
 30 toepassen en aanpassen waarbij een *Pichia pastoris* zuurfosfatase 1 (Pho1)-signaal in plaats van het van *Saccharomyces cerevisiae* afgeleide α -metingfactor (α MF) prepro-signaal, danwel pHIL-D1 voor intracellulaire expressie en vele andere worden toegepast.

Plasmide DNA werd geïsoleerd en de sequentie van het pCOL3A1 dat
 35 aldus werd gevormd (fig. 1) werd geverifieerd door sequentie-analyse volgens de methode van Sanger [6], onder toepassing van een geautomatiseerde sequentie-inrichting (ALF-DNA-sequencer, Pharmacia) en onder toepassing van de sequentieprimers van 5'AOX1, 3'AOX1 en α -Factor

(α MF), zoals voorgesteld in de *Pichia* Expression Kit (zie fig. 2). De verwachte eiwitsequentie voor het tot expressie gebrachte eiwit wordt aangegeven in fig. 3.

5 Transformatie van *Pichia pastoris* met pCOL3A1

Teneinde Mut⁺ transformanten te verkrijgen bij transformatie van *Pichia pastoris* werd het construct lineair gemaakt met SalI. Teneinde Mut⁻ transformanten te verkrijgen werd het construct aan digestie onderworpen met het BglII. Na extractie met fenol en precipitatie met ethanol werd het construct vervolgens toegepast voor het transformeren van *Pichia pastoris* stam GS115 (Invitrogen) onder toepassing van electroporatie volgens Becker en Guarente [7], onder toepassing van de BioRad GenePulser inrichting (ingesteld op 1500V, 25 μ F en 200 Ω en onder toepassing van 0,2 cm cuvetten. Het transformatiemengsel werd uitgeplaat op Minimaal Dextrose platen (MD-platen; 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotine, 1% dextrose en 1,5% agar) teneinde op aanwezigheid van de vector die de His⁻-stam GS115 omzet in His⁺ te selecteren. Na groei bij 30°C gedurende 3 dagen werden diverse kolonies geselecteerd voor bevestiging via PCR van het Mut genotype. Genomisch DNA werd geïsoleerd volgens gist miniprep-methode van Lee [8] en met RNase A behandeld. PCR werd uitgevoerd onder toepassing van 100 ng genomisch DNA, 50 pmol 5'AOX1-primer, 50 pmol 3'AOX1-primer, 1,25 U Taq-polymerase (Pharmacia), 0,2 mM dNTPs (Pharmacia) en 1x Taq-buffer (Pharmacia) in een totaal volume van 50 μ l. Na een eerste denaturatie bij 94°C gedurende 5 minuten werden 30 cycli uitgevoerd die bestonden uit 1 minuut bij 94°C, 1 minuut bij 5°C en 2 minuten bij 72°C. Uiteindelijke verlenging vond plaats bij 72°C gedurende 10 minuten. De PCR-inrichting die werd toegepast was de Perkin-Elmer GeneAmp 480. Agarosegelelektroforese zou een endogene AOX1 band van 2,2 kb voor Mut⁺ transformanten geven. Transformanten zonder 2,2 kb band zijn Mut⁻. Geverifieerde transformanten van zowel het Mut⁺ als Mut⁻ genotype werden gekozen voor expressie op kleine schaal in conische buizen van 50 ml (die schuin werden geplaatst en waarvan de deksel los werd vastgemaakt), of in 100 ml of 1 l (van schotten voorziene) flessen.

35

Expressie van COL3A1-fragment

Expressie werd uitgevoerd in hoofdzaak zoals is beschreven in het *Pichia* Expression Kit Handbook. In het kort werden transformanten

gedurende de nacht in BMG gekweekt (100 mm kaliumfosfaat pH 6,0, 1,34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotine en 1% glycerol) tot een $OD_{600}=2-6$. Kweken werden daarna gecentrifugeerd en in BMM geresuspendeerd (als MBG waarbij 0,5% methanol de glycerol vervangt) tot een OD_{600} van 1,0. Cellen werden
 5 gedurende 4 dagen bij 30°C en 250 rpm gekweekt waarbij dagelijks methanol tot 0,5% werd toegevoegd.

10 μ l van de kweeksupernatanten werd door SDS-PAGE volgens Laemmli [9] in een BioRad mini-PROTEAN-II-systeem geanalyseerd. Kleuring met Coomassie Brilliant Blue onthulde diverse banden waarvan
 10 de hoogste de verwachte schijnbare lengte had van ongeveer 29 kD. Het dient te worden opgemerkt dat gelatine, collageen en collageenfragmenten migreren volgens een schijnbare M_w , dat ongeveer een factor 1,4 hoger ligt dan het ware M_w , ten minste ten dele vanwege het betrekkelijk lage gemiddelde groep M_w [12].

15 Teneinde hun identiteit vast te stellen werd een SDS-PAGE-gel die was voorzien van met aceton gefractioneerde COL3A1 fermentatie- supernatant (zie hieronder voor het fractioneringsvoorschrift) op een Immobilon P^{sq} membrane (Millipore) geblot onder toepassing van de BioRad Mini Trans-blot-cel. Kwantitatieve overdracht werd bereid door
 20 100 volt gedurende 1 uur aan te brengen onder toepassing van CAPS-buffer (2,2 g CAPS per liter 10% MeOH, pH 11). Na kleuring met Coomassie Brilliant Blue werden de vier voornaamste banden uitgesneden en werd door middel van Edman-degradatie de N-terminale sequentie bepaald. De band van 29 kD gaf geen signaal en is waarschijnlijk N-
 25 terminaal geblokkeerd. Eén van de twee kleinere fragmenten was niet zuiver genoeg om gesequenced te worden. De twee andere kleinere banden gaven leesbare signalen en zijn in figuur 3 onderstreept. Het is duidelijk dat de banden worden veroorzaakt door een vorm van proteolyse, hetgeen kan worden verklaard door het feit dat gelatine een zeer
 30 open eiwit is in een willekeurige spoelconformatie en derhalve zeer vatbaar is voor proteolyse.

Protease-activiteit

35 Omdat toegenomen afbraak van het collageen werd waargenomen gedurende fermentatie bij pH 5,0 in vergelijking met pH 3,0 werden testen verricht teneinde deze degradatie verder te karakteriseren (zie hieronder voor een beschrijving van het fermentatievoorschrift). De testen werden uitgevoerd met de collageen bevattende supernatanten van een

pCOL3A1-fermentatie bij pH 3,0, waarbij afbraak gedurende fermentatie minimaal was. Na verwijdering van de cellen door centrifugatie werd de pH van de supernatanten ingesteld op pH 5,0. Daarna werden parallel-incubaties uitgevoerd met de volgende toevoegingen:

- 5 (1) verse *Pichia pastoris* cellen (met MilliQ gewassen)
- (2) verse *Pichia pastoris* cellen (met MilliQ gewassen) en glazen kralen: dit mengsel werd door middel van een vortex gemengd (positieve controle I)
- (3) zonder enige toevoeging (negatieve controle)
- 10 (4) trypsine (5 mg/ml) (positieve controle II).

Alle monsters werden gedurende 96 uur bij 30°C en pH 5,0 geïncubeerd. (Dit waren de omstandigheden die afbraak van het gelatine gedurende fermentatie veroorzaakten). Uiteindelijk werden de geïncubeerde monsters op een SDS-PAGE-gel volgens Laemmli [9] in een BioRad mini-
15 PROTEAN-II-systeem, gevolgd door Coomassie Brilliant Blue kleuring, geanalyseerd. De resultaten waren:

- (1) incubatie bij pH 5,0 met gewassen intacte cellen veroorzaakte afbraak van pCOL3A1 (oorspronkelijk bij pH 3,0 geproduceerd) in 4-5 discrete banden waarschijnlijk ten gevolge van aan
20 celoppervlak geassocieerde proteolytische enzymactiviteit;
- (2) toevoeging van gebroken cellen veroorzaakte afbraak van beide collageentypes in een groot aantal proteolytische producten (positieve controle I);
- (3) er trad geen afbraak op bij afwezigheid van cellen bij pH 5,0;
- 25 (4) toevoeging van trypsine veroorzaakte grootschalige afbraak van het gelatine (positieve controle II).

Bij verschillende experimenten verifieerden wij dat na verwijdering van de cellen aan het eind van de fermentaties de recombinante gelatines in de celvrije fermentatiebouillon gedurende een aantal
30 dagen stabiel waren in het temperatuurtraject van 0-30°C en in het pH-traject van 3,0-7,0. Aldus vond enige proteolytische afbraak van gelatine plaats gedurende fermentatie, doch blijft na verwijdering van cellen geen relevante proteolytische activiteit over en zijn verder geen maatregelen nodig het product te stabiliseren. Een soortgelijke
35 stabiliteit werd waargenomen voor de COL1A1-producten die hieronder worden beschreven. Deze stabiliteit van de recombinante gelatines kwam als een verrassing aangezien zij niet gehydroxyleerd zijn (zoals getoond door analyse van de aminozuursamenstelling zoals hieronder is

beschreven) en dienovereenkomstig non-helixstructuur hebben, dat wil zeggen geen secundaire structuur hebben. De totale afwezigheid van secundaire structuur (d.w.z. van het collageentype- helix) en van hydroxyproline werd geverifieerd, respectievelijk door middel van circulaire dichroïsche spectroscopie (CD) volgens referentie [13] en door HPLC-analyse van de aminozuur-samenstelling na volledige hydrolyse van de peptidebindingen. De recombinante gelatines zijn dus extreem open moleculen (en als zodanig niet parallel polypeptiden!) die extreem gevoelig moeten zijn voor proteolytische afbraak. De onverwachte stabiliteit van het product in deze expressiegastheer (eveneens na uitscheiding) vereenvoudigt ten eerste de stroomafwaartse verwerking en isolatie van het product uit dit expressiesysteem en maakt de herhaalbare toevoeging van kostbare en instabiele remmers van proteolytische activiteit (bijvoorbeeld para-methyl-sulfonylfluoride (PMSF)) overbodig. Daarnaast biedt het mogelijkheden voor het minimaliseren van gelatineafbraak gedurende fermentatie met een hoge celdichtheid viz. door continu het product van de cellen te scheiden gedurende fermentatie onder toepassing van eenvoudige microfiltratie of dialyse tegen voedingsmedium en door het recirculeren van de cellen aan de fermenteerinrichting. Voorheen waren slechts collageen met een drievoudige helix of gevouwen polypeptiden geproduceerd. Deze zijn meer bestand tegen proteasen. Drievoudige helix-collageen is zelfs volledig resistent tegen trypsine, pepsine en andere goed bekende proteasen. In tegenstelling hiermee werd vermoed dat de productie van intact niet gehydroxyleerd en ongevouwen gelatine extreem moeilijk zou zijn.

Productie in een protease-deficiënte stam

Teneinde te onderzoeken of de *pep4* voor proteïnase A deficiënte stam SMD1168 (Invitrogen) beter geschikt is voor de expressie van de voor protease gevoelige gelatinesequenties werd deze stam eveneens met het pCOL3A1-construct getransformeerd. De methodologie was zoals hierboven is beschreven. Helaas was er geen duidelijk positief effect in expressie-experimenten met schudfles of fermenteerinrichting.

35 Analyse van glycosylering

Teneinde vast te stellen of het eiwit geglycosyleerd is werd een kleuring met PAS onder toepassing van Schiff-reagens na oxidatie door perjodidezuur op een SDS-PAGE-gel uitgevoerd. De gel werd gedurende 1

uur op 12,5% TCA, 1 uur in 1% perjodidezuur/3% azijnzuur, 1 uur in 15% azijnzuur (elke 10 minuten vervangen) en 1 uur in Schiff-reagens (bij 4°C in het donker) geïncubeerd. De gel werd daarna 2 maal gedurende 5 minuten in 0,5 % natriumbisulfit gewassen en in 7% azijnzuur ont-
 5 kleurd. De banden van tot expressie gebracht eiwit gaven geen signaal, terwijl er een signaal was van een positieve controle (carboxypeptidase H). Zoals verwacht werd geen signaal verkregen met een negatieve controle (*E. coli* extract). Het kan worden geconcludeerd dat het tot expressie gebrachte eiwit niet geglycosyleerd is.

10

Northern Blotting

Een Northern blot van op methanol gekweekte cellen werd uitgevoerd. RNA werd geïsoleerd volgens de werkwijze van Schmitt et al. [10]. De pCOL3A1 vector werd aan digestie onderworpen met EcoRI/SphI
 15 ter verschaffing van een fragment van 0,5 kb COL3A1. Het fragment werd met ³²P willekeurige primer gemerkt en aan de blot gehybridiseerd waarna de blot werd gewassen bij een uiteindelijke strengheid van 0,2xSSC bij 65°C. Autoradiografie onthulde een boodschapper met de verwachte lengte (1,3 kb).

20

Pichia transformanten die meervoudige kopieën van het heterologe COL3A1-gen bevatten

Teneinde te onderzoeken of gelatine-expressieniveau's verder kunnen worden verbeterd is de G418-multi-kopie-selectiewerkwijze van
 25 Scorer et al [11] toegepast. De pPIC9K-vector werd aan digestie onderworpen met BamHI/EcoRI en de band van 9,0 kb werd geïsoleerd. De pCOL3A1-vector werd eveneens aan digestie onderworpen met BamHI/EcoRI en het resulterende fragment van 1,0 kb werd aan de pPIC9K-band van 9,0 kb geligeerd waarna *E. coli* JM109 werd getransformeerd. Het construct pCOL3A1K (Fig. 4) dat aldus werd verkregen werd geverifieerd
 30 door middel van restrictiedigestie.

Pichia pastoris GS115 werd met de pCOL3A1K vector getransformeerd zoals hiervoor is beschreven (na digestie met Sali teneinde Mut⁺ transformanten te verkrijgen). Teneinde op multikopie-transformanten te
 35 selecteren werden de his⁺kolonies op MD-platen samen gebracht (ongeveer 6000) en aan secundaire screening onderworpen op platen die een reeks van 10 verschillende G418 (Gibco-BRL)-concentraties bevatten, lopend van 0,25 tot 4,0 mg/ml. De cellen werden uitgeplaat bij een dichtheid

van ongeveer 10^5 cellen per plaat. Na incubatie gedurende 4 dagen bij 30°C werden diverse resistente kolonies bij elke G418-concentratie overgebracht naar verse platen bij de overeenkomstige hoeveelheid G418 teneinde hun resistentie te verifiëren.

5 Teneinde het kopie-aantal van de pCOL3A1K-vector in de G418-resistente transformanten te bepalen werd een semi-kwantitatieve dot blot uitgevoerd. Genomisch DNA van de geverifieerde G418 resistente transformanten werden geïsoleerd volgens het protocol van Lee [8] en met RNase A behandeld. Bij benadering 200 ng genomisch DNA van elk van
10 40 transformanten (4 per concentratie G418) werd overgebracht naar een positief geladen nylon membraan (Boehringer Mannheim) door middel van een vacuüm blotting inrichting (GibcoBRL Convertible System). Als 1-kopie-controle werd een pCOL3A1 transformant waarvan geverifieerd was dat deze slechts één kopie bevatte door middel van Southern blot
15 eveneens overgebracht op de blot (in duplo), naast een niet-getransformeerde controle (in duplo).

De pCOL3A1-vector werd aan digestie onderworpen met EcoRI/SphI ter verschaffing van 0,5 kb COL3A1-fragment. Dit fragment werd voorzien van een label met ^{32}P willekeurige primer en aan de dot-blot filter gehybridiseerd. Na spoeling bij een uiteindelijke strengheid van
20 0,5xSSC bij 65°C werd autoradiografie uitgevoerd. Na strippen (waarvan de efficiëntie is gecontroleerd) werd het membraan gehybridiseerd aan een probe die was verkregen van een geverifieerd *Pichia pastoris* URA3-fragment, dat door middel van PCR met heterologe URA3-primers was
25 opgepakt. Deze controle dient ter normalisatie van de COL3A1-signalen voor de hoeveelheid opgebrachte DNA. Het membraan werd gewassen en aan autoradiografie onderworpen zoals beschreven is voor de COL3A1-probe. De signalen op beide autoradiogrammen werden densitometrisch gekwantificeerd onder toepassing van een gelscan-inrichting (PDI, Pharmacia).
30 Zoals verwacht was er geen COL3A1-signaal voor de 0-kopie-controles, terwijl er een URA3-signaal was. Het kopie-aantal kan worden geschat door de verhouding van COL3A1-signaal voor elke transformant en het gemiddelde COL3A1-signaal die voor de 1-kopie-controles is verkregen, te berekenen als genormaliseerd door de verhouding van de respectieve
35 lijke URA2-signalen (d.w.z. om met verschillen in de hoeveelheid van DNA die op het membraan is geblot mee te nemen in de berekening). Transformanten die ongeveer 1 tot 15 kopieën bevatten werden aldus verkregen.

Expressie van COL3A1-fragmenten in multikopie-transformanten.

Een reeks transformanten die 1-15 kopieën bevatte werd aan expressie op kleine schaal onderworpen zoals hierboven is beschreven. Aangezien SDS-PAGE een hogere opbrengst bij hoger kopie-aantal aangaf, werden verdere testen uitgevoerd bij een schaal van 100 ml met de 2-, 5-, 10-, en 15-kopie-transformanten. Deze werden gedurende de nacht gekweekt in 100 ml flessen die 25 ml BMG (100 mM kaliumfosfaat pH 6,0, 1,34% YNB, $4 \cdot 10^{-5}\%$ biotine en 1% glycerol) bevatten. Na centrifugatie bij 1500-3000 g bij 5 minuten werden de cellen bij 100 ml BMM (als BMG maar met 0,5% methanol in plaats van glycerol) geresuspendeerd. Zij werden in 1 l flessen voorzien van schotten gekweekt bij 30°C en 250 rpm gedurende 4 dagen terwijl methanol elke dag tot 0,5% werd toegevoegd. Elke dag werden 1 ml monsters genomen en op SDS-PAGE geanalyseerd. Een hoger kopie-aantal resulteerde in een hogere hoeveelheid gelatineproduct. Geselecteerde 5- en 15-kopietransformanten werden toegepast voor expressietesten in een fermenteerinrichting op een schaal van 1 l. De hoogste COL3A1-productie werd verkregen met de 15-kopie-transformant (ongeveer 14,8 g gelatine/L in het extracellulaire medium bij een droge biomassa van 177 g/L en na ongeveer 184 uur fermentatie, d.w.z. ongeveer 7,7 g/L in totaal of 42 mg/(1.uur); bij een droge biomassa van 110 g/L en na ongeveer 120 uur fermentatie was het ongeveer 7 g gelatine/L in het extracellulaire medium, d.w.z. ongeveer 3,7 g/L totaal, of 31 mg/(1.uur)).

25 Kloning van een muis-COL1A1-fragment (COL1A1-muis)

Primers werden ontworpen voor de bekende sequentie (Fig. 5). PCR werd uitgevoerd op 17-daagse muisembryo met QUICK-Clone® (fibroblast) cDNA (Clontech), onder toepassing van 0,4 ng cDNA, 0,4 µM C1A1-FW-primer (Fig. 5), 0,4 µM C1A1-RV1-primer (Fig. 5), 1x Advantage KlenTaq polymerase mengsel (Clontec), 0,3 mM dNTP's (Pharmacia) en 1x KlenTaq PCR-reactiebuffer (ClonTaq) in een totaal volume van 20 µl. Na een oorspronkelijke denaturatie bij 94°C gedurende 4 minuten werden 35 cycli van 1 minuut bij 94°C, 1 minuut bij 68°C en 2 minuten bij 72°C uitgevoerd. Uiteindelijke verlenging vond plaats bij 72°C gedurende 10 minuten. Agarosegelelektroforese toont een band van 1 kb, die de grootte heeft die voorspeld werd door de sequentie. DNA werd uit de agarosegel geïsoleerd en vervolgens aan digestie onderworpen met restrictie-enzymen *NcoI* en *XhoI*. Het fragment werd na digestie uit aga-

rosegel geïsoleerd en in de *Pichia pastoris* expressie-vector pPIC9 gekloneerd volgens de volgende strategie (Fig. 6). Ten eerste werd een adapter die een *NcoI* en een *XhoI* plaats bevatte ingebracht in de meervoudige kloneringsplaats van pPIC9, hetgeen pPIC9^{*} gaf. De adapter werd
 5 bereid door de synthetische oligonucleotiden N-X-FW en N-X-RV te koppelen zoals getoond in Figuur 5 en Figuur 6. De enkelstrengige overhang die afstamt van het 5' uiteinde van oligonucleotide N-X-RV werd ontworpen teneinde een *EcoRI* plaats te vormen na koppeling met de met *EcoI* aan digestie onderworpen vector. De 5' overhang van N-X-FW (*XhoI*
 10 *I*^{*}) was complementair aan de overhang die werd gevormd door werking van *XhoI* op de vector maar gaf geen aanleiding tot een *XhoI* plaats na ligering. Omdat de doelvector pPIC9 een *NcoI* plaats heeft buiten de meervoudige kloneringsplaats is pUC18 toegepast als tussen-vector voor de klonering van dit fragment. De sectie tussen *BamHI* en
 15 *EcoRI* van de gewijzigde meervoudige kloneringsplaats van pPIC9^{*} werd overgebracht naar de meervoudige kloneringsplaats van pUC18-vector, resulterend in pUC18^{*}. Het met *NcoI*-*XhoI* aan digestie onderworpen fragment COL1A1-1 werd in de pUC18^{*}-vector geligeerd tussen de *NcoI* en *XhoI*-plaatsen. Uit dit pUC18-COL1A1-1 construct werd het COL1A1-1
 20 fragment samen met het gedeelte van de meervoudige kloneringsplaats van de pPIC9 aan digestie onderworpen met *BamHI* en *EcoRI* en pPIC9 geligeerd, waarbij het construct pCOL1A1-1 (Fig. 7) werd verkregen. Aldus was een gedeeltelijke digestie met *NcoI* van de pPIC9 niet nodig. De correcte inbreng van pPIC9 werd eerst gecontroleerd door restrictieanalyse en daarna door DNA-sequentievolgordebepaling.
 25

Transformatie van *Pichia* met pCOL1A1-1 en expressie van het COL1A1-1-fragment

Pichia pastoris GS115 werd getransformeerd met de pCOL1A1-1 vector zoals beschreven is voor de pCOL3A1-vector. Het *SalI* aan digestie
 30 onderworpen DNA werd toegepast teneinde specifiek Mut⁺ transformanten te genereren. Diverse transformanten werden toegepast voor expressie op kleine schaal in schudflessen en één hiervan werd gekozen voor expressie in de fermenteerinrichting op schaal van 1-100 l. Typische
 35 opbrengsten liggen in het gebied van 4-5 g gelatine/L in het (extracellulaire) medium (zoals bepaald na fractionering met aceton, zoals hieronder beschreven), bij een droge biomassa van 100-120 g/L (ongeveer 3 g gelatine/L in totaal). Het doel gelatine (Fig. 8) heeft

zijn theoretische M_w van 27,4 kD. Van collageenachtige eiwitten en gelatine is bekend dat zij migreren bij een schijnbaar M_w van ongeveer 1,4 maal hoger dan het ware M_w [10]. Daarmee in overeenstemming werd een band van SDS-PAGE die bij een schijnbaar M_w van ongeveer 38 kD

5 migreren waargenomen (geïnterpoleerde waarde die verkregen is met globulaire eiwit M_w -markers). Daarnaast werden drie kortere producten met een schijnbaar molecuulgewicht van 24,18 en 15 kD waargenomen (geïnterpoleerde waarden). Deze konden het resultaat zijn van vroege proteolytische activiteit in de intracellulaire, met celoppervlak

10 geassocieerde of extracellulaire compartimenten of door problemen op het niveau van translatie. De afbraakproducten waren reeds in zeer vroege inductiestadia aanwezig en er trad geen verdere afbraak op. Zelfs incubatie bij aanwezigheid van gewassen intacte cellen bij pH 5,0 en gedurende 96 uur bij 30°C veroorzaakte geen verdere afbraak van

15 pCOL1A1-1 met betrekking tot de situatie na fermentatie bij pH 3,0. (Grootschalige afbraak trad op bij aanwezigheid van trypsine als positieve controle). Teneinde te verifiëren dat problemen op mRNA-niveau niet verantwoordelijk waren voor het ontstaan van de producten van 24,18 en 18 kD werd Northern blotting uitgevoerd zoals beschreven

20 is voor COL3A1 onder toepassing van een met ^{32}P willekeurige primer gemerkte 1,0 kB *NcoI/XhoI*-COL1A1-fragment van pCOL1A1-1 als probe. De verwachte boodschapper van 1,6 kb werd gevonden. Teneinde de identiteit van de waargenomen fragmenten vast te stellen werd een SDS-PAGE-gel beladen met met aceton gefractioneerde COL1A1-1-fermentatie-

25 supernatans op een Immobilon- PSQ -membraan (Millipore) geblot onder toepassing van de Biorad-Mini-Trans-blot-Cell. (Zie hieronder voor een beschrijving van het acetonfractioneringsvoorschrift). Kwantitatieve overdracht werd bereikt door 100 Volt gedurende 1 uur aan te brengen onder toepassing van CAPS-buffer (2,2 g CAPS per liter van 10% MeOH,

30 pH 11). Na kleuring met Coomassie Brilliant Blue werden de vier meest prominente banden uitgesneden en werd de N-terminale sequentie door Edman-afbraak bepaald. De sequentiesignalen die werden verkregen waren zeer laag vergeleken met de hoeveelheid opgebracht materiaal (gemiddeld rond 5%). Het is derhalve waarschijnlijk dat de fragmenten

35 in het algemeen N-terminaal geblokkeerd waren. Dit ondersteunt het idee dat proteolyse van COL1A1-1 intracellulair plaatsvindt. De grote hoeveelheid COL1A1 die is geleverd liet niettegenstaande een eenvoudige bepaling van de N-terminale sequentie toe. De verkregen N-

terminale-sequenties worden onderstreept in de eiwit-sequentie (Fig. 8) zoals deze gecodeerd wordt door het getransfecteerde-COL1A1-1-gen. De fragmenten met een schijnbaar mW van 38 kD en 18 kD gaven beide de verwachte sequentie voor het N-uiteinde van het eiwit, echter verlengd met "EA". Van deze verlenging (of EAEA) is bekend dat deze aanwezig is op sommige eiwitten die tot expressie worden gebracht in expressievectoren onder toepassing van het van *Saccharomyces cerevisiae* afgeleide α -mating-factor (α -MF)-prepro-sigitaal. Van dit effect wordt aangenomen dat het te wijten is aan sterische hindering van STE13-splitsingsactiviteit. Echter omdat het grootste gedeelte van het eiwit waarschijnlijk N-terminaal geblokkeerd is, kan het wellicht zo zijn dat deze verlengde versie slechts de minderheidsfractie voorstelt die te sequencen is. Op basis van de N-terminale en interne sequenties werd aan de fragmenten met een schijnbaar M_w 38, 24, 18 en 15 kD-fragmenten toegewezen bestaande uit respectievelijk groep 1-310, 126-310, 1-125 en 42-125 van het doelproduct zoals getoond in Fig. 8, en theoretische M_w 's van 28, 16, 12 en 8 kD, respectievelijk. Fragmenten die overeenkomen met groep 1-41 (theoretisch M_w 4 kD) en 42-310 (theoretisch M_w 24 kD, schijnbaar M_w 34 kD) werden niet waargenomen. Dit kon zijn vanwege een (veel) frequentere splitsing tussen groep 125 en 126 dan tussen groep 41 en 42.

Kloning en expressie van muis-COL1A1-2

PCR is uitgevoerd op QUICK-Clone® cDNA van een 17-daagse muizenembryo (Clontec) op dezelfde wijze als voor muis-COL1A1-1 onder toepassing van C1A1-FW en C1A1-RV2-primer. Na denaturatie bij 94°C gedurende 4 minuten, werden 35 cycli uitgevoerd bij 1 minuut bij 94°C, 1 minuut bij 65°C en 3 minuten bij 72°C. Uiteindelijke verlenging vond plaats bij 72°C gedurende 10 minuten. Agarosegelelektroforese toont een band van 1,8 kD hetgeen de grootte is die wordt voorspeld uit de sequentie. De verdere klonering van COL1A1-2 in de pPIC9 expressievector is op dezelfde wijze uitgevoerd als voor COL1A1-1, hetgeen pCOLA1-2 leverde (fig. 9).

Pichia pastoris GS115 werd met de pCOL1A1-2 vector getransformeerd zoals is beschreven voor de pCOL3A1-vector. Met *Sal* I aan digestie onderworpen DNA werd toegepast teneinde specifiek Mut⁺ transformanten te genereren. Diverse transformanten werden toegepast voor expressie op kleine schaal in schudflessen en één hiervan werd gekozen voor

expressie in de fermenteerinrichting op een schaal van 1-100 l. Figuur 10 toont de verwachte COL1A1-2 aminozuursequentie. Typische opbrengsten liggen in het traject van 4-5 g gelatine/L in het (extracellu-
 lair) medium bij een droge biomassa van 100-120 g/L (ongeveer 3 g
 5 gelatine/L in totaal). Het doelgelatine (Fig. 10) heeft een theoretisch Mw van 53 kD.

Klonering en expressie van muis-COL1A1-3

10 PCR is uitgevoerd op QUICK-Clone™ cDNA van een muisembryo van 17 dagen (Clontech) op dezelfde wijze als voor muis-COL1A1-1 onder toepassing van C1A1-FW en C1A1-RV3-primer. Na denaturatie bij 94°C gedurende 4 minuten werden 35 cycli van 1 minuut bij 94°C, 1 minuut bij 65°C en 3 minuten bij 72°C uitgevoerd. Uiteindelijke verlenging
 15 vond plaats bij 72°C gedurende 10 minuten. Agarosegelelektroforese toont een band van 2,8 kb hetgeen de grootte is die voorspeld werd uit de sequentie.

De PUC18*-plasmide werd aan digestie onderworpen met NcoI en
 20 gedefosforyleerd. Het C1A1-FW/C1A1-RV3-PCR-product werd aan digestie onderworpen met NcoI en het resulterende fragment van 2,5 kb werd op een gel gezuiverd en in de met NcoI aan digestie onderworpen en defosforyleerde vector geligeerd. Na transformatie van *E. coli* XL1Blue, werd correcte oriëntatie van het ingevoegde stuk in de
 25 resulterende clonen geverifieerd door digestie met PvuII. De verdere clonering van COL1A1-3 in de pPIC9-expressie vector is uitgevoerd op dezelfde wijze als beschreven is voor COL1A1-1 hetgeen pCOL1A1-3 (figuur 11) gaf.

30 *Pichia pastoris* GS115 werd met de pCOL1A1-3 vector getransformeerd zoals is beschreven voor de pCOL3A1-vector. Met Sal I aan digestie onderworpen DNA werd toegepast ten einde specifiek Mut*-transformanten te genereren. Diverse transformanten werden toegepast voor expressie op kleine schaal in schudflessen en één daarvan werd gekozen voor
 35 expressie in de fermenteerinrichting op een schaal van 1-100 L. Figuur 12 toont de verwachte COL1A1-3-aminozuursequentie. Typische opbrengsten liggen in het gebied van 4-5 g gelatine/L in het extracellulaire compartiment (zoals bepaald na fractionering met

aceton zoals hieronder is beschreven) bij een droge biomassa van 100-120 g/L (ongeveer 3 g gelatine/L in totaal). Het doelgelatine (figuur 12) heeft een theoretisch Mw van 72 kD. In overeenstemming met deze waarde werd een SDS-PAGE band die migreerde bij een schijnbaar Mw van 5 ongeveer 100 kD waargenomen (geïnterpoleerde waarde verkregen met globulaire eiwit-Mw-markers). Daarnaast werden drie kortere producten met een schijnbaar Mw van 85, 18 en 15 kD waargenomen (geïnterpoleerde waarden). Indien de proteolytische splitsing op zou treden bij homologe plaatsen in de COL1A1-1 en COL1A1-3-expressieproducten (Fig. 10 8, 12), kan men verwachten dat fragmenten bestaande uit groep 1-595, 126-595, 1-125 en 42-125 van het COL1A1-3 product zou optreden. Deze zouden respectievelijk theoretische molecuulgewichten van 53, 42, 12 en 8 kD hebben die overeenkomen met schijnbare Mw's van 74, 58, 17 en 11 kD. Verrassenderwijs komt dit goed overeen met de waargenomen 15 schijnbare Mw's hetgeen aangeeft dat splitsing van COL1A1-2 voornamelijk was beperkt tot een binding tussen groep 125 en 126 en (in een mindere mate) de binding tussen 41 en 42. Wederom werden fragmenten die overeenkomen met groep 1-41 (theoretische Mw 4kD) en 42-812 (theoretisch Mw 68 kD, schijnbaar Mw 96 kD) niet waargenomen. 20 Dit kon zijn te wijten aan een (veel) frequentere splitsing tussen groep 125 en 126 dan tussen groep 41 en 42 zoals voor COL1A1-1 is genoemd.

Tabel 1 vat de schijnbare COL1A1-fragment-grootten die door 25 vergelijking van molecuulgewicht marker eiwitten zijn afgeleid (LMW Calibratie-kit; Pharmacia) samen met de grootte die uit de sequentie is berekend.

Tabel 1: schijnbare en theoretische molecuulgewichten van COL1A1-fragmenten

	Schijnbare molecuul- gewicht op SDS-PAGE gel	Molecuul gewicht gecorrigeerd voor 40% langzamere migratie	Groep	Molecuul gewicht berekend uit de sequentie	Genproduct
5					
	100 kD	71 kD	1-812	72 kD	(1A1-3)
10	85 kD	61 kD	125-812	61 kD	(1A1-3)
	74 kD	53 kD	1-595	54 kD	(1A1-2)
	56 kD	40 kD	125-595	42 kD	(1A1-2)
	38 kD	27 kD	1-310	28 kD	(1A1-1)
	24 kD	17 kD	125-310	16 kD	(1A1-1)
15	18 kD	13 kD	1-125	12 kD	(1A1-1,2,3)
	15 kD	11 kD	42-125	8 kD	(1A1-1,2,3)

Het is duidelijk uit tabel 1 dat het MGPR-model goed past bij de werkelijke fragmentgrootten.

- 20 Men kon eveneens fragmenten met groep 1-41 (4 kD; 1A1-1,2,3) en 42-310 (theoretisch Mw: 24 kD schijnbaar Mw: 34 kD; 1A1-1), 42-600 (theroetisch Mw: 50kD schijnbaar Mw: 70 kD; 1A1-2), of 42-600 (theoretisch Mw: 68 kD schijnbaar Mw: 96 kD; 1A1-3). Het feit dat deze fragmenten niet op gel worden gezien kan worden verklaard door aan te
- 25 nemen dat de splitsingssnelheid bij de tweede MGPR-plaats veel hoger is dan die bij de eerste plaats. Dit betekent dat wanneer het eiwitmolecuul wordt geknipt dit altijd eerst zal optreden bij de tweede plaats. Dit verschil in splitsingssnelheden kan worden verklaard door het feit dat de eerste plaats vooraf wordt gegaan door
- 30 een prolinegroep die mogelijk de protease-sterisch kan hinderen.

Muis-COL1A1-1, COL1A1-2 en COL1A1-3 RGPM-mutanten

- Wij hebben de mogelijkheid overwogen dat dezelfde aminozuursequentie die als herkenningsplaats voor proteolytisch enzym(en) dient
- 35 verantwoordelijk kon zijn voor de afbraak van alle COL1A1-producten (COL1A1-1, COL1A1-2, COL1A1-3). Verrassenderwijs werden beide interne en N-terminale sequenties die verkregen werden van de 15kD en 24kD

COL1A1-1 fragmenten voorafgegaan door dezelfde sequentie MGPR. Bovendien verschijnt deze sequentie slechts twee maal in de COL1A1-1, COL1A1-2, of COL1A1-3 genen van de muis te weten bij groep 83-41 en 122-125. (zoals vergeleken met COL1A1-1, COL1A1-2 en COL1A1-3 bevatten deze geen additionele MGPR-sites). Evenmin bevat het COL3A1-fragment van de rat zo'n plaats. Dit komt mooi overeen met de waargenomen splitsingspatroon. Derhalve geloven wij dat MGPR een motief is dat wordt herkend door een specifieke protease resulterend in de splitsing van de COL1A1-eiwitten. Deze MGPR-protease-herkenningsplaats is nog niet eerder beschreven. Een meer veralgemeniseerde voorstelling van het motief zou mogelijk kunnen zijn MXXR, MXX[RK] of zelfs [MLIV]XX[RKH]. De voorgaande motieven zijn inderdaad slechts tweemaal in het volledige muis COL1A1-gen aanwezig en ontbreken in het COL3A1-fragment, terwijl het laatste motief zo breed is dat het ook niet-gesplitste plaatsen omvat: MKGH bij groep 85-88 en VGAK bij groep 169-172 in COL1A1 en IKGH bij groep 198-201 in COL3A1. Derhalve zijn MXXR of MXX[RK] meer ogenschijnlijk de veralgemeniseerde motieven dan [MLIV]XX[RKH]. Figuur 13 toont de MGPR-motieven in de COL1A1-2-sequentie. Verwacht kan worden dat deze proteolytische splitsingsplaats slechts wordt herkend door de enzymen die betrokken zijn indien het in betrekkelijk open niet-gevouwen structuren voorkomt (zoals in onze gelatines) maar niet zo eenvoudig in meer compact gevouwen structuren (zoals in globulaire eiwitten). Derhalve zou het slechts van belang kunnen zijn bij bepaalde klassen eiwitten en polypeptiden waaronder gelatines en niet-gevouwen collagenen.

Teneinde COL1A1-1, COL1A1-2 en COL1A1-3 met volledige lengte te kunnen produceren zonder het optreden van de drie andere grote banden dienen de MGPR-motieven door plaatsgerichte mutagenese te worden verwijderd. Ten einde de oorspronkelijke aminozuursamenstelling van natuurlijk COL1A1-gelatine te bewaren werd het MGPR-motief verwijderd door omzetting naar RGPM. Twee paren complementaire primers werden gesynthetiseerd:

COL1A1MUT1FW:

R G P M

5'-GAG-CCT-GGC-GGT-TCA-GGT-CCA-CGA-GGT-CCA-ATG-GGT-CCC-CCT-GG-3'

COL1A1MUT1RV:

5'-CC-AGG-GGG-ACC-CAT-TGG-ACC-TCG-TGG-ACC-TGA-ACC-GCC-AGG-CTC-3'

5

COL1A1MUT2FW:

R G P M

5'-GGA-GCT-CCT-GGC-CAG-CGA-GGT-CCA-ATG-GGT-CTG-CCC-GGT-GAG-AG-3'

10 COL1A1MUT2RV:

5'-CT-CTC-ACC-GGG-CAG-ACC-CAT-TGG-ACC-TCG-CTG-GCC-AGG-AGC-TCC-3'

15 Let op: mutantposities zijn onderstreept; de oorspronkelijke C van de Pro-groep is omgezet in A teneinde de vorming van een NcoI-plaats te voorkomen.

Drie primer-combinaties werden toegepast:

1. 5'AOX1 primer en COL1A1MUT1RV
- 20 2. COL1A1MUT1FW en COL1A1MUT2RV
3. COL1A1MUT2FW en 3'AOX1

De reacties bevatten 1,25 U Pwo-polymerase (Eurogentec), 50 pmol van elke primer, 0,2 mM dNTPs (Pharmacia), 1x Pwo-buffer (Eurogentec) en 15 ng pCOL1A1-1-mal-DNA in een totaal reactievolume van 50µl. De PCR-
 25 inrichting die werd toegepast was de GeneAmp 9700 (Perkin-Elmer). Na een oorspronkelijke incubatie bij 94°C gedurende 5 minuten werden 18 cycli uitgevoerd die bestaan uit 30 seconden bij 94°C, 30 seconden bij 60°C en 45 seconden bij 72°C. Uiteindelijke verlenging werd uitgevoerd bij 72°C gedurende 10 minuten. Agarose-electroforese van de PCR-
 30 reacties onthulde producten met te verwachten grootten (resp. 0,5, 0,3 en 0,7 kb). De banden werden uit de gel gesneden en gezuiverd. De geïsoleerde fragmenten werden daarna aan overlapverlenging met PCR onderworpen. Bij benadering 0,1 pmol van elk fragment werd samen gemengd, 50pmol 5'AOX1 en 3'AOX1 primer werden toegevoegd alsmede Pwo-
 35 polymerase, dNTPs en buffer zoals hierboven beschreven. De cyclische condities waren dezelfde als hierboven is beschreven met uitzondering van het uitvoeren van de verlenging bij 72°C die gedurende 90 seconden in plaats van 45 seconden werd uitgevoerd. Agarosegel-electroferese

- onthulde het verwachte 1,5 kb product. De rest van de PCR-reactie werd gezuiverd onder toepassing van de Qiaquick PCR-ZuiveringsKit (Qiagen). Het gezuiverde DNA werd daarna aan digestie onderworpen met BamHI/ApaI waarna het resulterende fragment van 1,0 kb uit gel werd gezuiverd.
- 5 E.coli-stam JM110 werd met pCOL1A1-1, pCOL1A1-2 en pCOL1A1-3 getransformeerd teneinde de *dcm*-methylering van de ApaI-site verwijderen. Na DNA-isolatie werden de plasmiden aan digestie onderworpen met BamHI/ApaI. De resulterende vectorfragmenten respectievelijk van 7,9, 8,8 en 9,5 kb werden uit agarosegel gezuiverd
- 10 en in het met BamHI/ApaI digestie onderworpen PCR-product geligeerd. *E. coli* XL1Blue werd getransformeerd met deze ligatiereacties en plasmide-DNA van met PCR geverifieerde insertie bevattende clonen werden geïsoleerd en geverifieerd door geautomatiseerde sequentievolgordebepaling. De mutant-plasmiden pCOL1A1-1*, pCOL1A1-2*
- 15 en pCOL1A1-3* die aldus werden gevormd werden aan digestie onderwerpen met SalI en toegepast voor het transformeren van *Pichia pastoris* stam GS115. Expressie op kleine schaal en op fermentorschaal werd uitgevoerd zoals beschreven is voor COL1A1-1.
- 20 De SDS-PAGE-analyse toont duidelijk dat slechts één hoofdband van de verwachte grootte met volledige lengte wordt gevormd voor zowel COL1A1-1* als COL1A1-2* en COL1A1-3*.

Expressie/productie van gelatine in een fermentor

- 25 Gevoede ladingsgewijze fermentaties werden uitgevoerd volgens de *Pichia* fermentatieprocesrichtlijnen van Invitrogen. Cellen werden gekweekt in een fermentor van 1-liter (Applikon) in de oorspronkelijke experimentele stadia ten einde eiwitproductie te optimaliseren. Daarna werden cellen in een 20-liter of in een 140-liter fermentor gekweekt
- 30 (Biobench 20, Bio-pilo 14, Applikon) voor productie van collageen op pilot-schaal. Werkvolumes waren 1-liter, 15-liter en 100-liter respectievelijk. AD1020 controleerinrichtingen (Applikon) werden toegepast om de fermentatieparameters te volgen en te controleren. Het programma BioXpert (Applikon) werd voor data-opslag gebruikt. De
- 35 hoeveelheid opgeloste zuurstof werd gevolgd in de fermentor onder toepassing van een zuurstofelectrode (Ingold voor fermentaties van 1-liter, Mettler Toledo voor fermentatie op grotere schaal). Schudden (500-1000 rpm) en beluchting (1-2 vvm, d.w.z. $1-2\text{ L L}^{-1}\text{ min}^{-1}$) werden met

de hand ingesteld om de opgeloste zuurstofconcentratie boven 20% te houden. pH werd gemeten met een pH-electrode (Broadly James Cooperation) en automatisch door toevoeging van ammoniumhydroxide (25%) bij pH 3,0 of pH 5,0 gehouden hetgeen eveneens diende als
 5 stikstofbron voor de groei van de micro-organismen. Een anti-schuimelectrode werd toegepast teneinde overmatige schuimvorming te voorkomen. Indien noodzakelijk werd anti-schuim Structol J673 (Schill en Seilachter, Hamburg, Duitsland) toegepast. Groei van de micro-organismen werd gevolgd door bepaling van het droge gewicht van de
 10 cellen. Een calibratiecurve werd gemaakt waarbij het natte gewicht van de cel kan worden omgezet in het droge gewicht van de cel. Het droge gewicht van de cel werd bepaald na centrifugatie van monsters van 2 ml gedurende 5 minuten bij 15.000 rpm waarna het supernatant werd verwijderd. Het droge gewicht van de cel werd bepaald na toevoeging
 15 van 200 µl cellen aan een voorgedroogde filter (0,45 µm membraan, Schleicher & Schüll, Dassel, Duitsland) wassen met 25 ml gedeïoniseerd water en drogen in een magnetron gedurende 15 minuten bij 100 W. Het droge gewicht van de cel was bij benadering een factor 3 lager dan het natte gewicht van de cel. Voorcultures werden gestart
 20 uit kolonies op een MGY-plaat in flessen met een totaal van 10% van het oorspronkelijke fermentatievolume van MGY. Het volume van het medium bedroeg < 20% van het totale flesvolume. Cellen werden gekweekt bij 30°C bij 200 rpm in een roterende schudinrichting (Gallenkamp) gedurende 24-60 uur.

25

Fermentatiemedium

Het basale zoutmedium voor fermentatie in de fermentor bevatte per liter: 26,7 ml fosforzuur (85%), 0,93 g calciumsulfaat, 18,2 g kaliumsulfaat, 14,9 g magnesiumsulfaat. 7H₂O, 4,13 g kaliumhydroxide en
 30 40,0 g glycerol. Een hoeveelheid van 4,3 ml PTM₁ spoorzouten werd per liter basale zoutmedium voor fermentatie toegevoegd. PTM₁ spoorzouten bevatten per liter: 4,5 g koperchloride. 2H₂O, 0,09 g kaliumjodide, 3,5 g mangaanchloride. 4H₂O, 0,2 g natriummolybdaat. 2H₂O, 0,02 g boorzuur, 1,08 g kobaltsulfaat. 7H₂O, 42,3 g zinksulfaat. 7H₂O, 65,0 g
 35 ijzersulfaat. 7H₂O, 0,2 g biotine en 5,0 ml zwavelzuur. Spoorzouten werden over een filter gesteriliseerd (poriegrootte 0,22 µm, Costar, USA).

Fermentatie van mut⁻-kweken

De fermentor werd gesteriliseerd met het basale zoutmedium voor fermentatie. De 20-liter en 120-liter fermentor werden in situ gesteriliseerd met oorspronkelijke mediumvolumina van 5-7,5 liter en 5 50 liter respectievelijk. De 1-liter fermentor werd met 500 ml medium in een hoge drukpan gesteriliseerd. Na sterilisatie werd de temperatuur ingesteld op 30°C en werden schudden en beluchting ingesteld op 500 rpm en 1 vvm (d.w.z. 1 LL⁻¹H₂min⁻¹) respectievelijk. De pH werd ingesteld op een vastgesteld punt (meestal pH 5,0) met 25% 10 ammoniumhydroxide. Spoorzouten werden aseptisch aan het medium toegevoegd. De fermentor werd geënt met 10% van het oorspronkelijke fermentatievolume van pre-gekweekte cellen in MGY. De ladingsgewijze kweek werd gekweekt tot de glycerol volledig was verbruikt (18-24 uur). Dit werd aangeduid door een toename van de opgeloste 15 zuurstofconcentratie tot 100%. Het droge gewicht van de cel was in dit stadium 25-35 g/l. Daarna werd de gevoede ladingsgewijze fase met glycerol gestart door initiatie van een 50% (vol/vol) glyceroltoevoer die 12 ml PTM₁-spoorzouten per liter glycerol bevatte. De glyceroltoevoer werd ingesteld op 18 ml/uur/liter oorspronkelijke 20 fermentatievolume. De glyceroltoevoer werd gedurende vier uur uitgevoerd of bij een lange lagfase gedurende de nacht. Gedurende de glycerolladingsfase werd de pH van het fermentatiemedium verlaagd tot 3,0. De eiwitinductiefase werd geïnitieerd door een methanoltoevoer van 100% die 12 ml PTM₁ spoorzouten per liter methanol bevatte te 25 starten. De toevoersnelheid werd ingesteld op 3 ml/uur/liter oorspronkelijk fermentorvolume. Gedurende de eerste uren hoopte methanol zich op in de fermentor. Na 2-4 uur namen opgeloste zuurstofhoeveelheden af vanwege aanpassing aan methanol. De methanoltoevoer werd verhoogd tot 6 ml/uur oorspronkelijk fermentorvolume in 30 het geval van een snelle piek van opgelost zuurstof. Indien de koolstofbron beperkend is veroorzaakt het afsluiten van de koolstofbron een afname van de metabolische snelheid van de kweek en stijgt de concentratie opgeloste zuurstof (piek). Na een additionele 2 uur werd de methanolhoeveelheid vergroot tot 9 ml/uur/liter 35 oorspronkelijk fermentorvolume. Deze toevoersnelheid werd gedurende de rest van de fermentatie gehandhaafd. De fermentatie werd na 70-130 uur methanol in de gevoerde ladingsgewijze fase gestopt. Gedurende de fermentatie werden monsters van 2 ml genomen, gecentrifugeerd (5 min,

15.000 rpm) en werd het supernatant bij -20°C bewaard.

- Concentratie van gelatine en totaaleiwit werd bepaald na filtratie van de monsters (0,22 µm) en daarop volgende acetonfractionering (40 vol.% gevolgd door 60-80 vol.% aceton). De BCA-eiwitassay (Pierce) werd routinematig toegepast met gelatine van Merck als referentie. Volgens SDS-PAGE en analyse van de aminozuursamenstelling precipiteerden de niet-collagene eiwitten bij 40% aceton terwijl de COL3A1- en COL1A1-fragmenten precipiteerden bij 60-80%. Bij 60% aceton precipiteerden bij voorkeur de gelatinebestanddelen met een hoger molecuulgewicht. Bij toename van acetonconcentratie werd toegenomen precipitatie verkregen voor de hoofdafbraakproducten die boven zijn beschreven. Bij 80% waren alle hoofdafbraakproducten terug gevonden in het precipitaat (zoals gecontroleerd met SDS-PAGE).
- Kleine peptiden en andere verontreinigingen met laag molecuulgewicht bleven bij 80% aceton in oplossing.

- Aan het eind van de fermentatie werden de cellen door centrifugatie verwijderd (10.000 rpm, 30 min, 4°C) in het geval van de 1-liter fermentatie. Cellen werden in het geval van de 20-liter fermentatie door microfiltratie verwijderd. Het celbouillon werd eerst aangebracht op een microfiltratiemodule die een polyethersulfonmembraan bevatte met 0,50 µm poriegrootte (type MF 05 M2 van X-Flow, die in een RX 300 filtratiemodule van X-Flow was aangebracht). Daarna werd het supernatant aangebracht op een soortgelijk type microfiltratiemodule die een polyethersulfonmembraan met 0,2 µm poriegrootte bevatte (type MF 02 M1, eveneens van X-Flow). In het geval van de 120-liter fermentatie werden cellen verwijderd door een microfiltratie-eenheid op de schaal van een pilot plant die een polyethersulfonmembraan met 0,2 µm poriegrootte bevatte (type MF 02 M1 van X-Flow die in een R-10 membraanmodule was gebracht). Deze filtratie-eenheden worden slechts als voorbeelden genoemd. Het dient te worden begrepen dat elk geschikt microfiltratiesysteem kan worden toegepast om de cellen te verwijderen. Eventueel werd het gros van de cellen en afval door centrifugatie verwijderd en werden slechts het supernatant en het medium gebruikt om de cellen te wassen die op de microfiltratie-eenheden werden aangebracht. Als alternatief was het mogelijk het product uit het fermentatiebouillon te winnen en van de cellen te

scheiden door direct het fermentatiebouillon aan te brengen op een geschikte uitgebreide bedchromotografiesysteem onder toepassing van een hars die specifiek het geproduceerde gelatine bindt. Met succes werd SP Sepharose XL Streamline van Pharmacia als kationuitwisselaar in geëxpandeerde bedmode bij pH 3-4 toegepast.

Fermentatie van Mut^s-kweken

Glycerol ladingsgewijze en gevoede ladingsgewijze fasen werden uitgevoerd zoals beschreven is voor de mut^s-kweken. Aangezien Mut^s-kweken methanol slecht metaboliseren is hun zuurstofconsumptie zeer laag. Derhalve kunnen pieken van de opgeloste zuurstofconcentratie niet worden toegepast om de kweek te evalueren. De methanoltoevoer werd ingesteld om een overmaat methanol in het medium te handhaven die echter 0,3% niet overschrijdt. De methanoltoevoer werd begonnen bij 1 ml/uur/liter oorspronkelijk fermentatorvolume en langzaam verhoogd tot 3 ml/uur/liter. De totale fermentatietijd die vereist was bij het gebruik van Mut^s-kweken was aanzienlijk langer dan wanneer Mut^s-kweken werden toegepast.

20

Preparatieve zuivering van collageen/gelatine op een preparatieve schaal

Na de microfiltratiestap werden twee alternatieve zuiveringsstrategieën gevolgd (zie I, II hieronder).

25

I. Zuivering door differentiële precipitatie

Aceton fractionering

Collageen type I en type III werden gedeeltelijk uit ladingen van 500 ml gezuiverd tot 2 liter supernatant door een acetonfractionering van 40-80%. Bij 40% aceton werden de niet-collagene eiwitten (uit *Pichia*) geprecipiteerd terwijl bij 60-80% aceton collageen alsmede collageenafbraakproducten werden geprecipiteerd zoals getoond door SDS-PAGE en analyse van de aminozuursamenstelling. Bij 60% aceton worden bij voorkeur de gelatinebestanddelen met een hoger molecuulgewicht geprecipiteerd. Bij toenemende acetonconcentratie werd toenemende precipitatie verkregen voor de hoofdafbraakproducten die boven zijn beschreven. Bij 80% werden alle hoofdafbraakproducten in

het precipitaat gewonnen (zoals gecontroleerd met SDS-PAGE). Kleine peptiden en andere laag-molecuulgewicht-verontreinigingen bleven in oplossing bij 80% aceton. Aceton werd gedurende 2 tot 4 uur bij -20°C gekoeld. Een hoeveelheid van 40% ijskoude aceton (vol/vol) werd
 5 langzaam aan het voorgekoelde supernatant van de fermentatie toegevoegd bij 4°C onder magnetisch roeren. Supernatant werd gedurende de nacht bij 4°C geroerd. Geprecipiteerde eiwitten en deeltjes werden door centrifugatie verwijderd (4°C, 10.000 rpm, 30 minuten). De pellet werd in 40% ijskoude aceton geresuspendeerd en nogmaals
 10 gecentrifugeerd. Beide 40% aceton supernatantfracties werden samengebracht. Daarna werd het supernatant op 60-80% aceton gebracht (vol/vol) en gedurende de nacht geroerd. Geprecipiteerde eiwitten werden door centrifugatie verzameld. De pellet werd in 60-80% aceton geresuspendeerd en nogmaals gecentrifugeerd. De pellet werd opgelost
 15 in een geschikte hoeveelheid 5 mM azijnzuur/ammoniumhydroxidebuffer bij pH 3,0 (buffer A) tot een eiwitconcentratie van 20-50 g/l.

Ammoniumsulfaatprecipitatie

Polysacchariden werden daarna door precipitatie van het
 20 gelatine/collageen verwijderd bij 60% verzadiging van ammoniumsulfaat, waarbij de polysacchariden in oplossing bleven. Ammoniumsulfaat werd langzaam tot 60% verzadiging toegevoegd bij 4°C. Na roeren gedurende 60 minuten werd het monster gecentrifugeerd (30 min, 4°C, 10.000 rpm). De pellet werd in 60% ammoniumsulfaat geresuspendeerd en nogmaals
 25 gecentrifugeerd. Indien meer dan 1% (gew/gew) polysacchariden of suikers aanwezig bleven werd de volledige precipitatievoorschrift met ammoniumsulfaat zoals hierboven is beschreven herhaald na volledig opnieuw oplossen van het gelatine/collageen bij afwezigheid van ammoniumsulfaat. Uiteindelijk werd de pellet opgelost in gedeïoniseerd
 30 water of in buffer A tot een eiwitconcentratie van 20-50 g/l. De pH van het monster werd ingesteld op 3,0. Het monster werd door dialyse tegen buffer A ontzout welke buffer elke vier uur werd verversd. Dialysemembranen van geregenereerde cellulose (Spectra Por[®] werden toegepast met een moleculair afsnijgewicht van 8kD. De dialyse werd na
 35 2-7 dagen gestopt op het moment dat de geleidbaarheid van het monster geschat werd voldoende laag te zijn (gewoonlijk 20-150 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ boven achtergrond). Geleidbaarheid werd gemeten met een digitale geleidbaarheidsmeter (radiometer) die met 1 mM en 10 mM KCl-

oplossingen was gecalibreerd (140 en 1400 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectievelijk). Als alternatief voor dialyse werden ultrafiltratie en diafiltratie toegepast om de monsters te ontzouten en (eventueel de monsters te concentreren. Waar toepasbaar werd het product vervolgens voorgedroogd
 5 (eventueel) door precipitatie met hoge concentraties aceton en verdamping van aceton en uiteindelijk gevriesdroogd.

II. Zuivering door kationuitwisselingschromotografie

10 De kationuitwisselingshars was SP Sepharose XL (Pharmacia Biotech) maar andere geschikte harsen konden eveneens worden toegepast. De zuivering werd op diverse schalen uitgevoerd. Aldus werd een 25 ml bed in een XK 16 kolom (Pharmacia) toegepast. Proeven werden uitgevoerd met een FLPLC (Pharmacia). Bedhoogte bedroeg 12,5 cm. Stroomsnelheden
 15 bedroegen gewoonlijk 1 ml/min. Op een tussenschaal werd een bed van 100 mL toegepast waarbij de proeven werden geregeld door een Äkta Explorer geïntegreerde pomp/processor/meervoudige klep/meervoudige detecteereenheid (Pharmacia). Op pilotschaal werd een 2-liter bed in een Index 140/200 kolom toegepast. Bedhoogte bedroeg tenminste 13 cm.
 20 Proeven werden uitgevoerd met de Äkta explorer pompprocessor-unit (Pharmacia) of andere pompsystemen. Stroomsnelheden waren 50-100 ml/min of hoger. Bij wijze van voorbeeld werden het volgende buffersysteem en elutie-omstandigheden toegepast. Buffer X was een 5 mM citroenzuurbuffer bij pH 3,2, buffer Y een 5 mM citroenzuurbuffer
 25 met 1 M NaCl bij pH 3,0. De kolom werd in evenwicht gebracht met 2-5 bedvolumina buffer X. Het eiwit van belang werd met een lineaire gradiënt van 0-0,5 M NaCl in 5-10 kolomvolumina geëluëerd. De hoofdband van collageentype III elueerde bij 50-100 mM NaCl. De hoofdband van collageentype I elueerde bij 70 mM NaCl, de andere
 30 banden tussen 30-150 mM NaCl, in overeenstemming met de theoretische iso-electrische punten. De kolom werd met 1 bedvolumebuffer Y gezuiverd. Op een pilotschaal werden de samengevoegde fracties ontzout en geconcentreerd bijvoorbeeld door toevoeging van 80% aceton en vervolgens gevriesdroogd.

35

Karakterisering van het gelatine/collageenproduct

De aminozuursamenstelling werd bepaald na volledige door HCl uitgevoerde hydrolyse van de peptide-bindingen bij zeer lage pH en

verhoogde temperatuur gevolgd door derivatisering van de aminozuren met een fluorofoor en HPLC.

5 Het verwachte van zuiver collageen percentage Gly is 33%. Dit biedt een middel voor het schatten van de zuiverheid van geproduceerde recombinante gelatinen. Ten einde voor het percentage Gly in endogeen afgescheiden eiwitten van *Pichia pastoris* te corrigeren werd aminozuursamenstellingsanalyse uitgevoerd op fermentatiesupernatant van een Mut⁺-transformant van pPIC9. Het percentage Gly dat werd
10 gevonden bedroeg 9%. De zuiverheid van een monster kan nu geschat worden door de formule:
$$(\%Gly-9)/(33-9) = (\%Gly-9)/24.$$

Na oplossing van monsters in MilliQ-water werden de volgende assays
15 uitgevoerd.

Het eiwitgehalte werd bepaald door middel van de BCA-assay van Pierce onder toepassing van gelatine van Merck als referentie.

20 De verdeling van eiwit-Mw werd bepaald onder toepassing van SDS-PAGE.

Het suikergehalte werd bepaald door middel van een assay op basis van fenol. Monsters van 200 µL werden met 200 µL 5% (gew/gew) fenol gemengd. Na grondig mengen onder toepassing van een Vortex
25 menginrichting werd 1 mL geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. Na mengen werden de monsters gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur en daarna gedurende 20 minuten bij 30°C geïncubeerd. Na koeling werd de lichtabsorptie van de monsters bij 485 nm bepaald. Zetmeel, glucose en sucrose werden toegepast om calibratiecurves te bereiden.

30 Het DNA-gehalte werd bepaald door gelijke hoeveelheden verdund SYBR Green I nucleïne-zuurgel-kleur (10.000 x conc. in DMSO) van Molecular Probes met onze monsters te mengen. Na grondige spectrale analyse werd de excitatie-golflengte gekozen op 490 nm en de emissiegolflengte op
35 523 nm. De calibratie vond plaats door daarna bekende hoeveelheden DNA als interne standaarden aan dit zelfde mengsel toe te voegen. Aldus werd een calibratiecurve geconstrueerd. Verder werd gecontroleerd dat daarop volgende toevoeging van DNA afbrekend enzym resulteerde in

volledige afbraak van het fluorescentie-signaal.

Een kwantitatieve indicatie van het RNA- plus DNA-gehalte werd vervolgens verkregen onder toepassing van SYBR Green II "RNA
 5 gelkleuring" in plaats van SYBR Green I. Na grondige spectrale analyse werd de excitatiegolflengte gekozen op 94 nm en de emissie golflengte op 514 nm. Calibratie vond plaats door daarop volgende toevoeging van een bekende hoeveelheid RNA. De resulterende waarde werd het RNA-gehalte van een monster genoemd. Bij afwezigheid van DNA kwam dit
 10 overeen met de ware RNA-gehalten. Indien aanwezig zou met DNA geassocieerde fluorescentie een afwijking voor de RNA-waarden hebben kunnen geven hoewel een uiteindelijke toevoeging van RNase werd toegepast om de van DNA en RNA afgeleide bijdrage aan de fluorescentie te onderscheiden.

15

De geleidbaarheid van de monsters werd gemeten onder toepassing van een digitale radiometergeleidbaarheidsmeter waarbij gecontroleerd werd dat oplossing van 1 en 10 mM KCL in milliQ-water waarden gaven van respectievelijk van 140 en 1400 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$.

20

Data over zuiverheid van sommige gelatineladingen die geproduceerd zijn in overeenstemming met de uitvinding (voorbeelden)

25 GATO4a (col3a1)

- ongeveer 2,4 gram

- zuivering:

microfiltratie, precipitatie (1x acetonfractionering (40% / 80%),
 1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), dialyse tegen 5mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ -buffer voor het
 30 onder pH 4 houden van het monster (aanvangs pH rond 3,5; buffer werd bereid door verdunning van 500 mM azijnzuur ingesteld op pH 3,0 met 25% $(\text{NH}_4)\text{OH}$), lyofilisatie

- DNA: < 1 ppm (gew./gew.)

- RNA: 12,7 ppm (gew./gew.)

35 - totale suikers: 4,5% (gew./gew.)

- gelatine werd niet tijdens zuivering afgebroken (SDS-PAGE: figuur 14)

GATO4b (col3a1, verder gezuiverd dan GATO4a)

- ongeveer 1 gram
- zuivering:
 - 5 verder gezuiverd uit GATO4a door het herhalen (additionele 2x) van ammoniumsulfaatprecipitatie gevolgd door dialyse tegen 5mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ -buffer voor het onder pH 4 houden van het monster (aanvangs pH rond 3,5; buffer werd bereid door verdunning van 500 mM azijnzuur ingesteld op pH 3,0 met 25% $(\text{NH}_4)\text{OH}$), lyofilisatie
- DNA: < 0,56 ppm (gew./gew.)
- 10 - RNA: 3,2 ppm (gew./gew.)
- totale suikers: 0,94% (gew./gew.)
- gelatine werd niet tijdens zuivering afgebroken.
- specifieke geleiding na dialyse rond $180 \mu\text{Scm}^{-1}$ bij 10 g gelatine/L (specifieke geleiding van buffer rond $100 \mu\text{Scm}^{-1}$)
- 15 - specifieke geleiding na lyofilisatie en het oplossen van een monster: $180 \mu\text{Scm}^{-1}$ bij 10 g gelatine/L, $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ bij 5 g gelatine/L

GATO5 (coll1a1-1)

- 20 - ongeveer 0,9 gram
- zuivering:
 - microfiltratie, precipitatie (1x acetonfractionering (40% / 80%), 1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), dialyse tegen 5mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ -buffer voor het onder pH 4 houden van het monster (aanvangs pH rond 3,5; buffer werd bereid door verdunning van 500 mM azijnzuur ingesteld op pH 3,0 met 25% $(\text{NH}_4)\text{OH}$), lyofilisatie
- 25 - DNA: < 1 ppm (gew./gew.)
- RNA: 87 ppm (gew./gew.)
- totale suikers: 4,5% (gew./gew.)
- 30 - gelatine werd niet tijdens zuivering afgebroken (SDS-PAGE: figuur 15)

GATO6 (col3a1 gezuiverd door uitgebreid-bed-kationen-uitwisselingschromotografie)

- 35 - rond 50 mg
- zuivering:
 - uitgebreid-bed- kationenuitwisselingschromotografie bij pH 3-3,5 (SP-Sepharose-XL "Streamline" hars van Pharmacia Biotech;

suikergehalte na sub-optimaal spoelen van de kolom en elutie bij 0,3 M NaCl: 1,8% (gew./gew.), verdere verwijdering van suiker door een enkele precipitatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, gevolgd door dialyse tegen 5 mM NH_4^+ / CH_3COO^- -buffer (pH rond 3,5), lyofilisatie

- 5 - DNA: < 1 ppm (gew./gew. reeds voor precipitatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en dialyse)
- RNA: < 9 ppm (gew./gew. reeds voor precipitatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en dialyse)
- totale suikers: 1,1%.
- 10 - specifieke geleiding na dialyse rond $94 \mu\text{Scm}^{-1}$ bij 0,55 g gelatine/L
(specifieke geleiding van buffer: rond $100 \mu\text{Scm}^{-1}$).
- gelatine werd tijdens zuivering niet afgebroken.
- 15 CAT07 (colla1-2)
- 400 mg
- zuivering:
 - microfiltratie, precipitatie (1x aceton fractionering (40% / 71,5%), 3x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), van tevoren ontzouten door aceton-
 - 20 precipitaties: 1x 71,5%, 1x 80%, dialyse tegen MilliQ-water, lyofilisatie
- DNA: nog niet bekend, nog te bepalen
- RNA: nog niet bekend, nog te bepalen
- 25 - totale suikers: 0,7% (gew./gew.)
- specifieke geleiding na dialyse rond $15,5 \mu\text{Scm}^{-1}$ bij 4 g gelatine/L
- gelatine werd tijdens zuivering niet afgebroken

REFERENTIES DIE IN VOORBEELD 1 ZIJN GECITEERD

- 30 [1] Capello, J. & Ferrari, F. (1994) in: Plastics from microbes (Mobley, D. P., ed.) Hanser, Munich, pp. 35-92
- [2] Strausberg, R. L. & Link, R. P. (1990) TIBTECH 8: 53-57.
- 35 [3] Maniatis T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- [4] Manual of the *Pichia* Expression Kit Version E (Invitrogen, San Diego, CA, USA).
- 5 [5] - Glumoff, V., Mäkelä, J. K. & Vuorio, E (1994) Cloning of cDNA for rat pro α 1(III) collagen mRNA. Increased expression of type III collagen gene during induction of experimental granulation tissue. *Biochim Biophys Acta* 1217: 41-48.
- EMBL/GenBank accession number X70369.
- 10 [6] Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- 15 [7] Becker, D. M. & Guarente, L. (1991) High efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymology*, vol. 194: 182-187.
- [8] Lee, F. J. S. (1992) *Biotechniques* 12 (5): 677
- 20 [9] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [10] Schmitt, M. E., Brown, T. A. and Trumpower, B. L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18 (10): 3091.
- 25 [11] Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A. & Sreekrishna, K. (1994) Rapid Selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio/Technology* 12: 181-184.
- 30 [12] Butkowsky R. J., Noelken, M. E. & Hudson, B. G. (1982) Estimation of the size of collagenous proteins by electrophoresis and gel chromatography. *Meth. Enzymol.* 82: 410-423.
- 35 [13] De Wolf, F. A. & Keller R. C. A (1996) Characterization of the helical structures in gelatin networks and model polypeptides by circular dichroism. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 102: 9-14

Voorbeeld 2 (controle)

Bereiding van zilverbromide kristallen met conventionele reguliere gelatine type

Kernvorming: Bij een temperatuur van 35°C in een reactievat dat 2,1 g/l reguliere gelatine bevat (een standaard gedeïoniseerde IAG-bot gelatine van PB Gelatins, Tessenderlo, België) en 7,3 mM kaliumbromide is met natriumhydroxide of zwavelzuur de pH ingesteld op een waarde van 5,5. Door toevoeging met behulp van een enkele jet onder heftig roeren is een waterige oplossing van 144 mM zilvernitraat in een constante hoeveelheid gedurende een periode van 10 sec. toegevoegd. Na toevoeging van het zilvernitraat is de gelatine-concentratie in het reactiemengsel 2,0 g/l en bromide-concentratie 1mM geworden.

Rijpingsstap: Na kernvorming wordt de inhoud van het vat overgebracht naar een rijpingsvat waar de temperatuur geleidelijk wordt verhoogd tot een waarde van 3,4 M kaliumbromide-oplossing. De rijping wordt voortgezet gedurende 56 minuten waarna een standaard gedeïoniseerde gelatine wordt toegevoegd tot een concentratie van 5 g/l; na 58 minuten is de Ostwald-rijpingsstap sterk verlaagd door het toevoegen van een oplossing van methyl-fenyl-tetrazool en door tot kamertemperatuur af te koelen. Een monster van de bereide emulsie werd geanalyseerd door middel van directe transmissie electronenmicroscopie alsmede door herhaling daarvan.

Resultaat: Zoals in tabel II kan worden gezien wordt een hoog % niet-tabulaire korrels gevormd.

25

Voorbeeld 3 (controle)

Bereiding van zilverbromidekristallen met conventionele gehydrolyseerde gelatines.

Kernvorming: De kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van dezelfde omstandigheden (eveneens pH=5,5) als in voorbeeld 2 met uitzondering van het feit dat de gelatine in het reactiemengsel wordt vervangen door een conventionele gehydrolyseerde gelatinemonster (eveneens gedeïoniseerd en door PB Gelatins, Tessenderlo in België geleverd).

Rijping: Rijping wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als in voorbeeld 2 is toegepast.

Resultaat: Een gemiddeld % tabulaire korrels van 50-70% wordt in tabel II getoond.

Voorbeeld 4 (controle)

Bereiding van zilverbromidekristallen met geoxydeerde gelatines.

Kernvorming: De kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van dezelfde omstandigheden (eveneens pH=5,5) als in voorbeeld 1 met
 5 uitzondering van het feit dat de gelatine in het reactiemengsel wordt vervangen door een conventionele geoxydeerde gelatinemonster (geleverd door Nitta Gelatines in Japan).

Rijping: De rijping wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als in voorbeeld 2 is toegepast.

10 Resultaat: Een hoog % tabulaire korrels van 90% met een gemiddelde aspect ratio van 4:1 wordt in tabel II getoond voor de geoxydeerde gelatines bij pH 5,5. Het betere resultaat dan met de gehydrolyseerde en reguliere gelatines kan worden uitgelegd wegens het lagere methionine-gehalte van deze gelatine (11 µmol/gram gelatine vs. 50-60
 15 µmol/gram voor conventionele ge'atines).

Voorbeeld 5 (de onderhavige uitvinding)

Bereiding van zilverbromidekristallen met de uitgevonden natieve recombinant-gelatines.

20 Kernvorming: De kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van dezelfde omstandigheden (eveneens pH=5,5) als in voorbeeld 2 met uitzondering van het feit dat de gelatine in het reactiemengsel wordt vervangen door een monster van het uitgevonden natieve COL3A1 gelatine.

25 Rijping: De rijpingsstap wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als is toegepast in voorbeeld 2.

Resultaat: Een hoog % tabulaire korrels van 90-100% met een gemiddelde aspect-ratio van 4:1 wordt getoond in tabel II.

30 Voorbeeld 6 (controle)

Bereiding van zilverbromidekristallen met conventionele reguliere regelatines bij een ander pH.

Kernvorming: de kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van de toestand met pH=7 terwijl andere omstandigheden hetzelfde blijven als
 35 in voorbeeld 2.

Rijping: De rijping wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als is toegepast in voorbeeld 2 met uitzondering van het feit dat de pH hetzelfde blijft als gedurende de kernvorming dat wil zeggen pH=7.

Resultaat: Een zeer laag percentage tabulaire korrels van <<5% was het resultaat zoals in tabel I is getoond voor conventionele commerciële gelatine.

5 Voorbeeld 7 (controle)

Bereiding van zilverbromidekristallen met conventionele gehydrolyseerde gelatines bij een andere pH.

Kernvorming: De kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van een andere toestand $\text{pH}=7$ terwijl de andere omstandigheden hetzelfde bleven als in voorbeeld 2.

Rijping: De rijping wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als is toegepast in voorbeeld 2 met uitzondering van het feit dat de pH hetzelfde bleef op pH=7 als gedurende de kernvorming.

Resultaat: Een zeer laag % tabulaire korrels rond 5% was het
15 resultaat zoals getoond wordt in tabel II

Voorbeeld 8 (controle)

Bereiding van zilverbromidekristallen met geoxideerde gelatine bij een ander pH.

20 Kernvorming: De kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van een ander pH-toestand. Dat wil zeggen pH=7 terwijl de andere omstandigheden hetzelfde bleven als in voorbeeld 3.

Rijping: De rijping wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als is toegepast in voorbeeld 3 met uitzondering van het feit dat de pH hetzelfde bleef als tijdens de kernvorming dat wil zeggen op pH=7.

Resultaat: Een zeer laag % tabulaire korrels rond 5% met aspect-ratio 4:1 zoals getoond is in tabel II.

Voorbeeld 9 (deze uitvinding)

30 Bereiding van zilverbromidekristallen met uitgevonden natieve
recombinante gelatines bij een ander pH.

Kernvorming: De kernvorming wordt uitgevoerd onder toepassing van een andere pH-toestand dat wil zeggen pH=7 terwijl de andere omstandigheden hetzelfde bleven als in voorbeeld 4.

35 Rijping: De rijping wordt uitgevoerd volgens hetzelfde voorschrift als in voorbeeld 4 is toegepast met uitzondering van het feit dat de pH hetzelfde blijft als gedurende de kernvorming dat wil zeggen pH=7.

Resultaat: Een zeer hoog percentage tabulaire korrels > 90% wordt

verrassenderwijs gevonden bij deze toestand hetgeen duidelijk hoger ligt dan voor de stand van de techniek gelatines zoals getoond wordt in tabel II.

Voorbeeld 10

5

Verhouding tussen bindingssterkte en tabulaire korrelmorfologie.

45 mg gelatine wordt nauwkeurig afgewogen en 15 g 0,1M fosfaatbuffer met pH=7,00 die 0,1M kaliumnitraat bevat wordt toegevoegd. De oplossing wordt in een waterbad geplaatst gedurende 15 minuten bij 10 45°C. De oplossing wordt tot kamertemperatuur afgekoeld (23°C).

10 ml van deze fosfaatbufferoplossing met pH 7,0 (die gelatine bevat) wordt bij 23°C gemengd met 100 µl 0,5 mM zilvernitraat. Het potentiaal van deze oplossing wordt betiteld als "vAg" en wordt gemeten onder toepassing van een Ag-electrode (Orion model 97-81) tegen een Ag/AgCl 15 dubbele overgangsreferentie-electrode (Orion model 90-02). Dezelfde bufferoplossing zonder gelatine wordt eveneens met de zilvernitraatoplossing gemengd en via dezelfde methode wordt het potentiaal "vAg" gemeten. Het verschil tussen de twee gemeten potentialen wordt berekend en uitgedrukt als "delta VAg" hetgeen de 20 bindingsaffiniteit is van gelatine voor het zilverion.

Op basis van de waarneming met de elektronenmicroscopie dat de Ag-kristallen van het geoxideerde gelatine een lager aspectratio (4:1) hebben dan de andere gelatinegroep met een hogere aspectratio (5:1) werd de bindingssterkte gescheiden in twee verschillende groepen 25 namelijk de groepen betiteld lage en hoge bindingssterkte.

De geoxideerde gelatinereferentie heeft verreweg het laagste methioninegehalte van 11 µmol/gram gelatine hetgeen resulteert in minder binding en derhalve ook de vorming van meer kernen die twinning hebben ondergaan. Aangezien geen additionele zilverionen in de 30 rijpingsstap worden toegevoerd zal het hogere aantal tabulaire kernen die twinning hebben ondergaan dezelfde hoeveelheid zilverionen verbruiken en dientengevolge zullen meer tabulaire korrels worden verkregen die minder kunnen groeien en derhalve een lager aspectratio hebben.

35 Tabel II hieronder toont de geteste peptizeermiddelen, de % tabulaire korrels en gelatine bindingsaffiniteiten "delta VAg" voor pH 5,5 en pH 7:

Type gelatine	Bindingssterkte "delta VAg" (mV)		% tabulair bij kernvorming/ rijping pH=5,5		% tabulair bij kernvorming/ rijping pH=7,0	
			aspect >4:1		ratio	
geoxideerd	55,4		70-80		< 5	
gehydrolyseerd	74,4		50-70		> 5	
regulier	78,5		0-30		<< 5	
nat.rec COL3	69,5		90-100		> 90	

5

CONCLUSIES

1. Een dunne tabulaire zilverhalide-emulsie waarbij de tabulaire korrels meer dan 75% van de totale korrel geprojecteerde oppervlak
5 voor hun rekening nemen welke emulsie zilverhalidekorrels omvat die kernvorming hebben ondergaan bij aanwezigheid van peptiseermiddel en daarna zijn gegroeid bij aanwezigheid van peptiseermiddel, waarbij het peptiseermiddel in hoofdzaak zuiver collageenachtig materiaal is dat is bereid door genetische manipulatie van voor natief collageen
10 coderend nucleïnezuur, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die meer dan 4 verschillende aminozuren omvat.
2. Emulsie volgens conclusie 1, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die meer dan 3, zelfs meer dan 10 aminozuren
15 omvat die verschillend zijn.
3. Emulsie volgens conclusie 1 of 2, waarbij de aminozuursequentie van het peptiseermiddel meer dan 40% homologie vertoont met natieve collageen bij voorkeur meer dan 50%.
- 20 4. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die equivalent is met die die in de natuur voor collageen voorkomt, waarbij equivalent een aminozuuridentiteit van ten minste 80% bij voorkeur ten minste 90% met
25 meer voorkeur een aminozuursequentie die hetzelfde is als in de natuur voorkomt impliceert.
5. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die in hoofdzaak
30 hetzelfde is als voorkomt in de natuur, waarbij in hoofdzaak een mutatie van minder dan 5 aminozuren bij voorkeur minder dan 3 impliceert.
6. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het
35 peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft in hoofdzaak hetzelfde als in de natuur voorkomt voor collageentype I, II of III.
7. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het

peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die equivalent is met de aminozuursequentie die in de natuur voorkomt voor collageentype I, II of III.

5 8. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft hetzelfde als voorkomt in de natuur voor collageentype I, II of III.

9. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het
10 collageentype I de aminozuursequentie van figuur 8, 10 of 12 of Genbank toegangsnummer U08020 omvat of heeft.

10. Emulsie volgens één van de conclusies 1-7, waarbij het collageentype III de aminozuursequentie van figuur 3 of EMBL
15 toegangsnummer X70369 omvat of heeft.

11. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft in hoofdzaak hetzelfde als voorkomt in de natuur voor collageentype I, welk peptiseermiddel
20 vrij is van de sequentie MGPR.

12. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel een fragment is met gedefinieerde lengte en samenstelling dat is verkregen van een sequentie die voor een natieve
25 collageen codeert, welk fragment het GXY motief dat kenmerkend is voor collageen omvat, welke lengte zodanig is dat het fragment een gewicht heeft van ten minste 2,5 kDa betrokken op aminozuur.

13. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het
30 peptiseermiddel vrij is van hydroxyproline.

14. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel niet gedeamineerd is.

35 15. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel een iso-elektrisch punt van 7-10 heeft.

16. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het

peptiseermiddel een gewicht van 2,5-100 kDa heeft betrokken op
aminozuur.

17. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
5 peptiseermiddel vrij is van procollageen en telopeptiden.

18. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
peptiseermiddel vrij is van helixstructuur.

10 19. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
peptiseermiddel vrij is van cysteïne.

20. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
peptiseermiddel (geoxideerde) reducerende aminozuren omvat in een
15 zodanige mate dat reducerende aminozuren aanwezig zijn in een
hoeveelheid die equivalent is met een reducerende sterkte tussen 0,1-
200 micromol methionine per gram van het peptiseermiddel.

21. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
20 peptiseermiddel (geoxideerde) reducerende aminozuren omvat in een
zodanige mate dat reducerende aminozuren aanwezig zijn in een
hoeveelheid die equivalent is met een reducerende sterkte van tussen
0,1-80 micromol methionine per gram van het peptiseermiddel.

25 22. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
peptiseermiddel (geoxideerde) reducerende aminozuren omvat in zodanige
een mate dat reducerende aminozuren aanwezig zijn in een hoeveelheid
die equivalent is met een reducerende sterkte tussen 30-80 micromol
methionine per gram van het peptiseermiddel.

30

23. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
peptiseermiddel een bindingssterkte voor zilver heeft hoger dan 50 mV.

24. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
35 peptiseermiddel een bindingssterkte heeft voor zilver beneden 100 mV.

25. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welk
peptiseermiddel een bindingssterkte voor zilver heeft tussen 50-100

mV.

26. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij de zilverhalidekorrels een gemiddelde aspectratio vertonen groter dan 3.

5

27. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel stabiel is vis a vis zilverhalide tabulaire korrelvorming bij een pH tussen 4-8.

10 28. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, die tabulaire korrels omvat in een hoeveelheid groter dan 90% bij voorkeur groter dan 95%.

15 29. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel van homodisperse aard is.

20 30. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, waarbij het peptiseermiddel aanwezig is in in hoofdzaak zuivere vorm dat wil zeggen in hoofdzaak vrij van nucleïnezuur, polysacchariden en ander eiwit.

25 31. Emulsie volgens één van de voorgaande conclusies, welke emulsie geschikt is voor fotografische toepassing en verdere verbindingen omvat die aanvaardbaar zijn voor een dergelijke toepassing bijvoorbeeld een tweede duidelijk gedefinieerde hoeveelheid peptiseermiddel.

30 32. Werkwijze voor het bereiden van een dunne tabulaire zilverhalide-emulsie waarbij de tabulaire korrels meer dan 75% van de totale korrel geprojecteerde oppervlak voor hun rekening nemen welke werkwijze de kernvorming van zilverhalidekorrels bij aanwezigheid van peptiseermiddel en het daarna groeien van de zilverhalidekorrels bij aanwezigheid van peptiseermiddel omvat waarbij beide peptiseermiddelen aanwezig zijn in een gedefinieerde hoeveelheid en beide
35 peptiseermiddelen collageenachtig materiaal zijn dat is bereid door genetische manipulatie van nucleïnezuur dat codeert voor natief collageen welke peptiseermiddelen een aminozuursequentie hebben die meer dan 4 verschillende aminozuren omvat.

33. Werkwijze voor het bereiden van een emulsie volgens conclusie 32 die toevoeging van het peptiseermiddel in de kernvormingstap en/of gedurende de korrelgroeistap omvatten welk peptiseermiddel wordt gekozen uit één van de uitvoeringsvormen zoals beschreven in één van de conclusies 1-31, 51 of 52.

34. Werkwijze voor het bereiden van een emulsie volgens conclusie 32 of 33, welke toevoeging van het peptiseermiddel omvat in zowel de kernvormingsstap als gedurende de korrelgroeistap.

10

35. Werkwijze voor het bereiden van een emulsie volgens één van de conclusies 32-34 die toevoeging van hetzelfde peptiseermiddel in de kernvormingsstap als gedurende de korrelgroeistap omvat.

15 36. Werkwijze van fotografische elementproductie die toepassing van een emulsie volgens één van de conclusies 1-31 of zoals verkrijgbaar uit een werkwijze volgens één van de conclusies 32-35 voor het verkrijgen van een zilverhalide-emulsie omvat voor toepassing in een op zich bekende wijze voor fotografische elementproductie met ten
20 minste één zilverhalide-emulsielaag, waarbij de zilverhalidekristallen van de laag een aspectratio van 5 of meer hebben.

37. Werkwijze volgens conclusie 36 welk fotografisch element een materiaal is dat gevoelig is voor licht-, laser- of röntgenstralen,
25 welk element bijvoorbeeld wordt gekozen uit zwart-wit positieve film, zwart-wit negatieve film, kleur-negatieve film, kleur-positieve film, digitale film, zwart-wit-positief papier, zwart-wit-negatief papier, kleur-negatief papier, kleur-positief papier, digitaalpapier.

30 38. Fotografisch element verkregen volgens de werkwijze volgens conclusie 36 of 37.

39. Werkwijze ter bereiding van collageenachtige recombinant-polypeptide welke werkwijze expressie van een voor collageenachtig
35 polypeptide-coderende nucleïnezuur sequentie door een micro-organisme omvat tot een mate die 0,95 gram/liter overschrijdt, welk recombinant collageen vrij is van helixstructuur waarbij bij voorkeur de expressie plaatsvindt in een micro-organisme anders dan *E. coli* of *Saccharomyces*

cerevisiae.

40. Werkwijze volgens conclusie 39 waarbij de expressie 3 gram/liter overschrijdt.
- 5
41. Werkwijze volgens conclusie 39 of 40 waarbij het collageenachtige recombinant poly-peptide wordt gekozen uit één van de uitvoeringsvormen die is beschreven in één van de conclusies 1-31, 51 of 52.
- 10
42. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-41 waarbij het micro-organisme in staat is expressieproduct uit te scheiden.
43. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-42 waarbij het micro-organisme een gistcel is.
- 15
44. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-43 waarbij het micro-organisme vrij is van actief postverwerkingsmechanisme voor het verwerken van collageenachtige sequenties tot fibrillen.
- 20
45. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-44 waarbij het micro-organisme vrij is van actief postverwerkingsmechanisme voor het verwerken van collageenachtige sequenties tot drievoudige helices.
- 25
46. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-45 waarbij de tot expressie te brengen nucleïnezuursequentie vrij is van voor procollageen en telopeptide coderende sequenties.
47. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-46 waarbij het micro-organisme *Pichia pastoris* is.
- 30
48. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-47 waarbij het recombinant collageen een aminozuursequentie heeft vrij van protease-splitsingsplaatsen voor een protease die actief is in de expressiegastheercel.
- 35
49. Werkwijze volgens één van de conclusies 39-48 waarbij het expressieproduct wordt eiwit, polysaccharide geïsoleerd en gezuiverd

tot het in hoofdzaak vrij is van ander eiwitpolysaccharide en nucleïnezuur.

50. Werkwijze volgens één van de conclusies D1-D11 waarbij het
5 expressieproduct wordt geïsoleerd en gezuiverd tot tenminste de
volgende mate: gehalte aan nucleïnezuur minder dan 100 ppm, gehalte
polysaccharide minder dan 5%, gehalte aan RNA geschikt minder dan 10
ppm, gehalte aan DNA minder dan 1 ppm en polysaccharidegehalte minder
dan 1%.

10

51. In hoofdzaak zuiver collageenachtig materiaal dat is bereid door
genetische manipulatie van nucleïnezuursequentie coderend voor natief
collageen welk peptiseermiddel een aminozuursequentie heeft die meer
dan 40% homologie met natief collageen vertoont en meer dan 4
15 verschillende aminozuurtypes omvat.

52. Recombinant-collageenverbinding gedefinieerd in één van de
conclusies 1-31.

fig -1

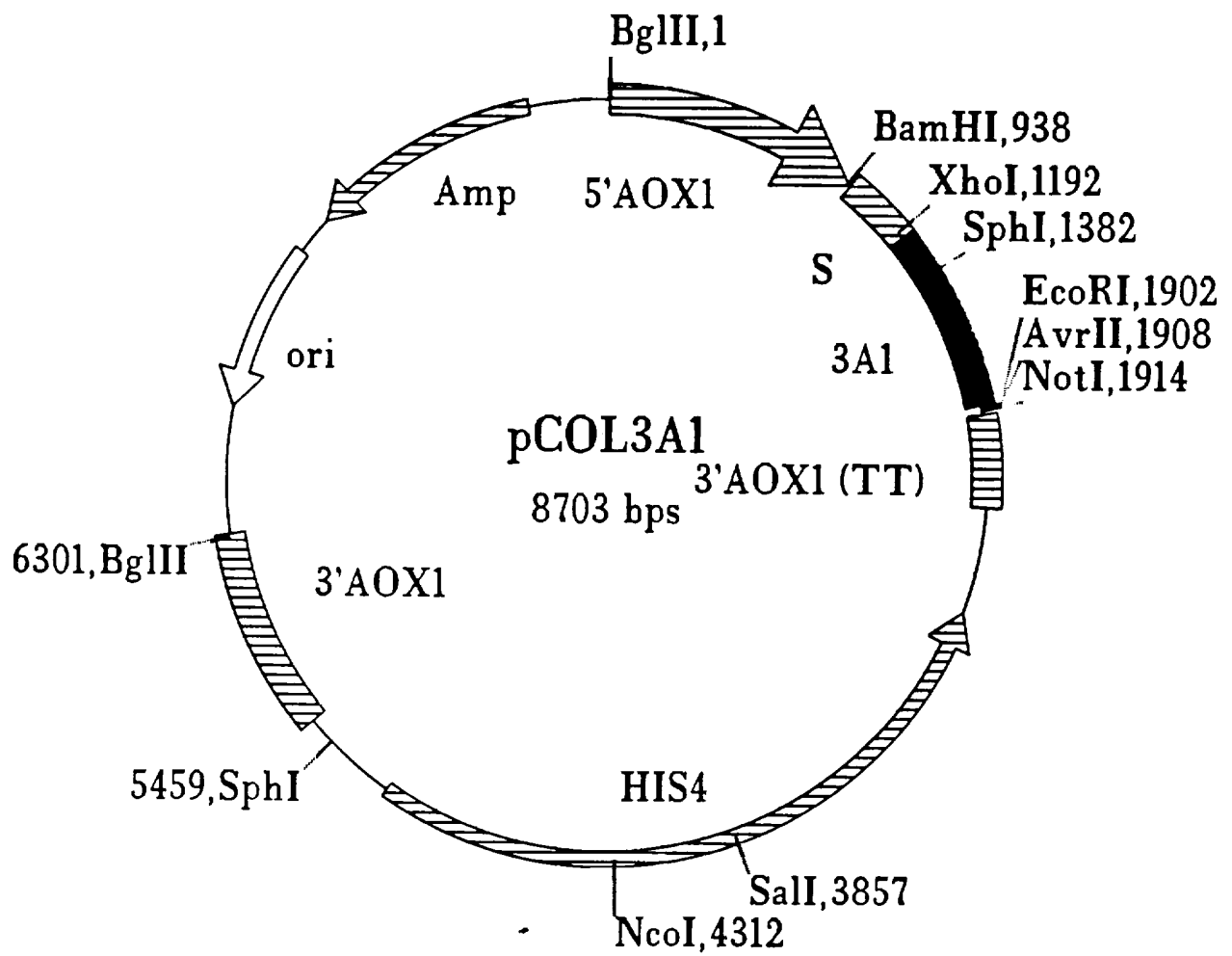


Fig. 2. PCR primers voor pCOL3A1 construct–controle

5'AOX1: 5'–GACTGGTTCCAATTGACAAGC–3'

3'AOX1: 5'–GCAAATGGCATTCTGACATCC–3'

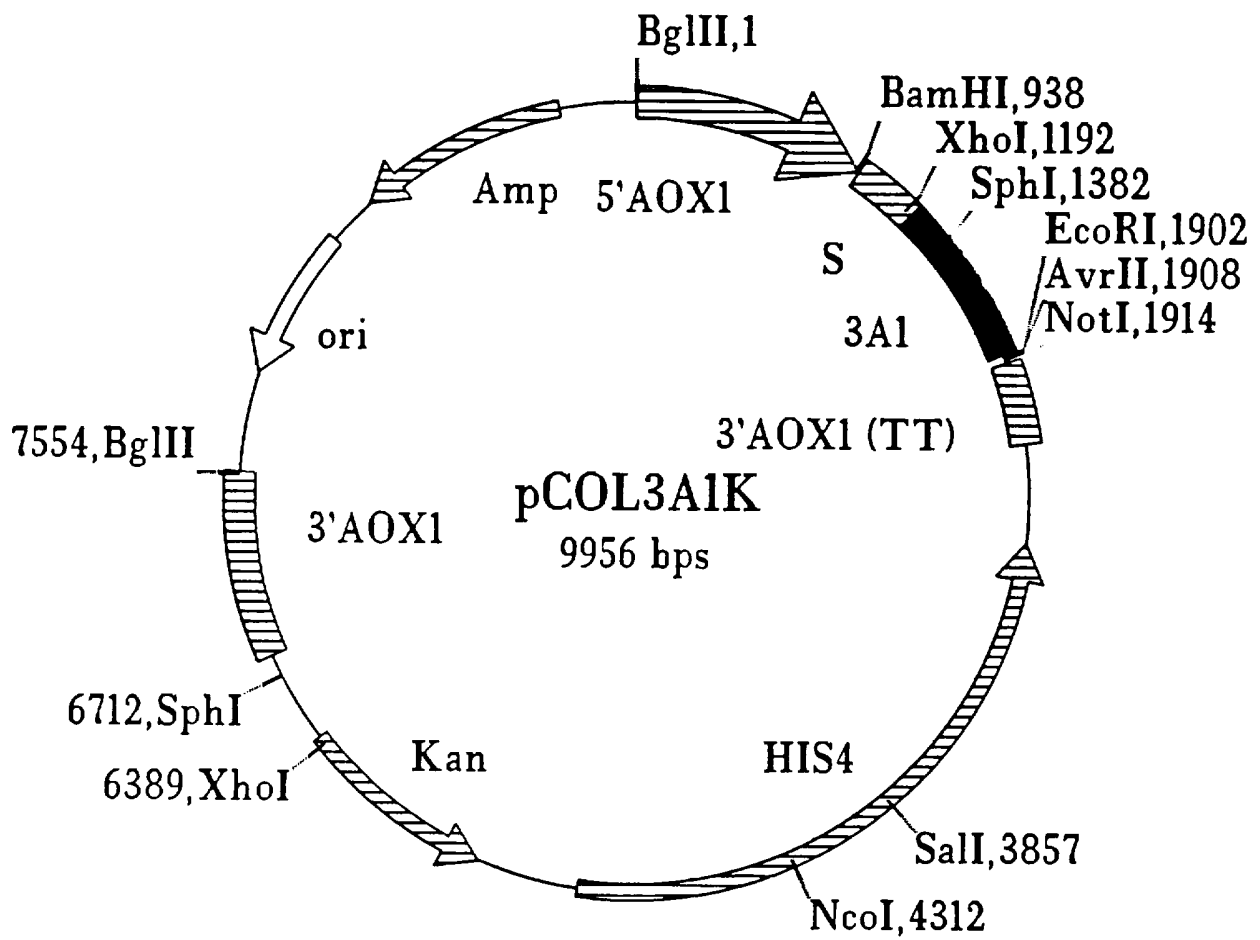
α MF: 5'–TACTATTGCCAGCATTGCTGC–3'

Fig. 3. verwachte COL3A1 sequentie

1 YGNSGSPGNP GVAGPKGDAG QPGEKGPPGA QGPPGSPGPL GIAGLTGARG LAGPPGMPGP
 61 RGSPGPQQGIK GESGKPGASG HNGERGPPGP QGLPGQPGTA GEPRDGNPG SDGQPGRDGS
 121 PGGKGDRGEN GSPGAPGAPG HPGPPGPVGP SGKNGDRGET GPAGPSGAPG PAGARGAPGP
 181 QGPRGDKGET GERGSNGIKG HRGFPGNPGP PGSPGAAGHQ GAVGSPGP

- *1. De N-terminale Y stamt af van de pPIC9 vector, de rest van de sequentie komt van COL3A1 van de rat.
- *2. De onderstreepte sequenties komen overeen met de N-terminale sequenties die voor COL3A1-fragmenten zijn verkregen.

fig - 4



Figuur 5.

Oligo sequenties voor de clonering van COL1A1

CL1A1-FW : 5'-CTTCCCAGATGTCCTATGGCTATGATG-3'
 CL1A1-RV1 : 5'-CCGCTCGAGGCGCTCGCCAGGAGTCCAGGCAG-3'
 CL1A1-RV2 : 5'-GCGCTCGAGGGGAGGACCAATGGGACCCAGTCAG-3'
 CL1A1-RV3 : 5'-GCGCTCGAGGCCAGGAGAACCCAGGAGGCCCTG-3'

N-X-FW : 5'-TCGAAAAGAGAGAGGCTGAAGCTCCCATGGGATAACTCGAGTAGG-3'
 N-X-RV : 5'-AATTCCTACTCGAGTTATCCCATGGGAGCTTCAGCCTCTCTCTTT-3'

==> Na annealing de volgende adaptor:

5'-TCGAAAAGAGAGAGGCTGAAGCTCCCATGGGATAACTCGAGTAGG -3'
 3'- TTTCTCTCCGACTTCGAGGGTACCCCTATTGAGCTCATCCTTAA-5'

fig - 6

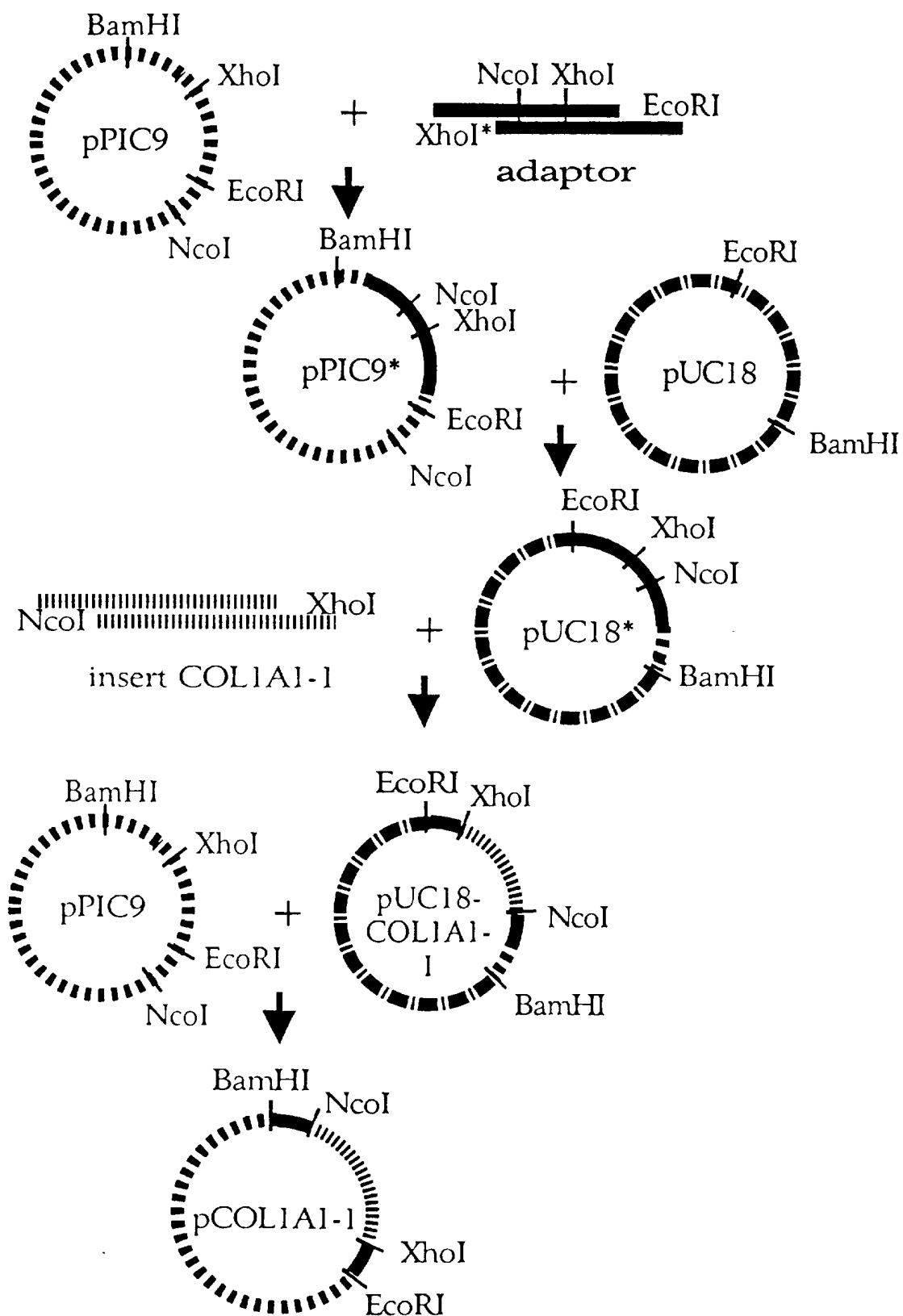


fig - 7

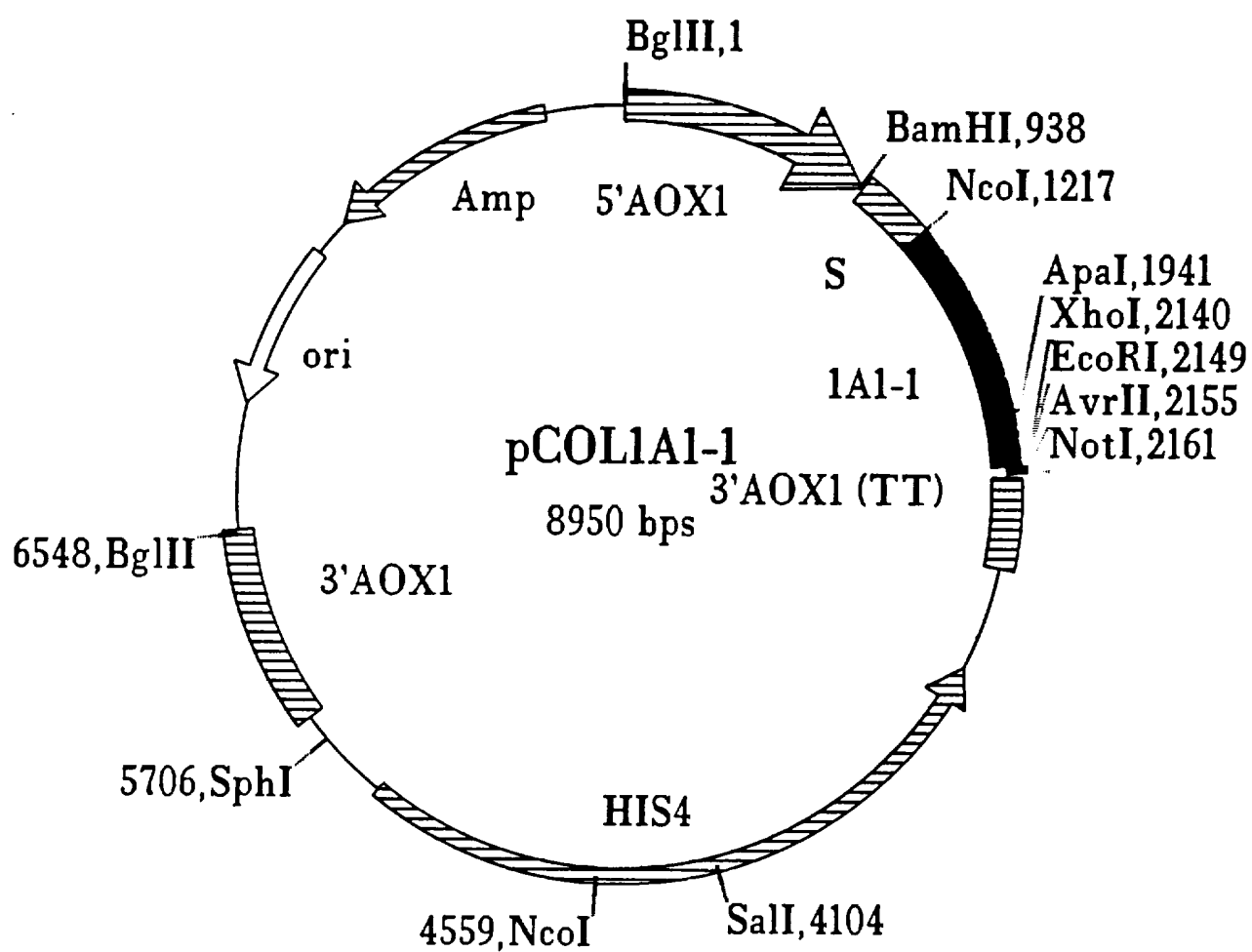


Fig. 8. Verwachte COL1A1-1 sequentie*

1 PMGPSGPRGL PGPPGAPGPQ GFQPPGEPG EPGSGPMGP RGPPGPPGKN GDDGEAGKPG
 61 RPGERGPPGP QGARGLPSTA GLPGMKGHRG FSLDGAAGD AGPAGPKGEP GSPGENGAPG
 121 QMGPRGLPGE RGRPGPPGTA GARGNDGAVG AAGPPGPTGP TGPPGFPGAV GAKGEAGPQG
 181 ARGSEGPGQV RGEPPGPPGA GAAGPAGNPG ADGQPGAKGA NGAPGIAGAP GFPGARGPSG
 241 PQGPSGPPGP KGNSGEPGAP GNKGDGAKG EPGATGVQGP PGPAGEEGKR GARGEPPGSG
 301 LPGPPGERLE

- *1. De onderstreepte sequenties komen overeen met de N-terminale sequenties die voor de COL1A1-fragmenten zijn verkregen.
- *2. De dubbele onderstreping betekent dat twee fragmenten deze sequentie deelden. Beide fragmenten werden aan het N-uiteinde met 'EA' verlengd.

fig - 9

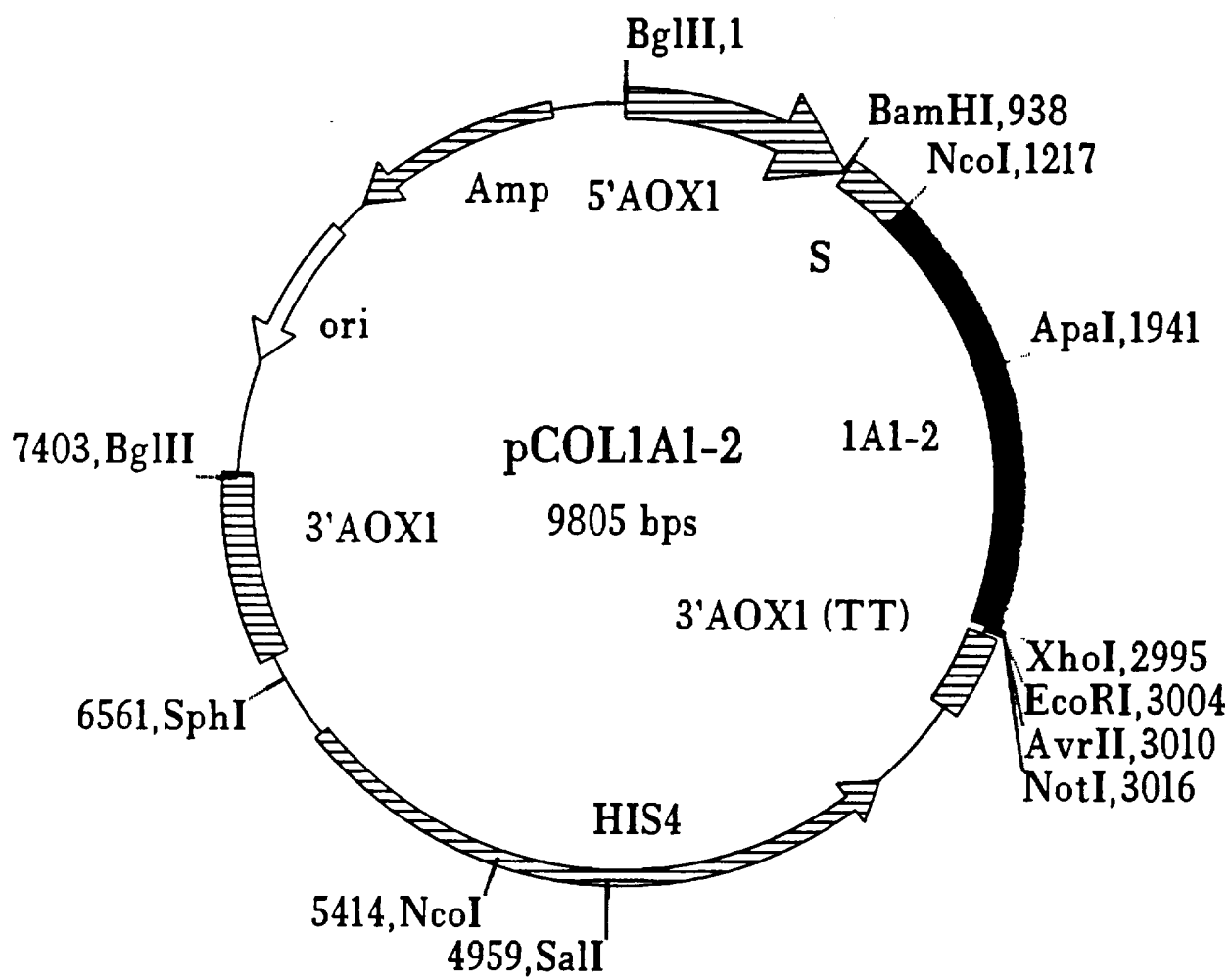


Fig. 10. Verwachte COL1A1-2 sequentie

1 PMGPSGPRGL PGPPGAPGPQ GFQPPGEPG EPGSGPMGP RGPPGPPGKN GDDGEAGKPG
61 RPGERGPPGP QGARGLPGTA GLPGMKGHRG FSLDGAKGD AGPAGPKGEP GSPGENGAPG
121 QMGPRGLPGE RGRPGPPGTA GARGNDGAVG AAGPPGPTGP TGPPGFPGAV GAKGEAGPQG
181 ARGSEGPQGV RGEPPPGPA GAAGPAGNPG ADGQPGAAGA NGAPGIAGAP GFPGARGPSG
241 PQGPSGPPGP KNSGEPGAP GNKGDGTAKG EPGATGVQGP PGPAGEEGKR GARGEPPSG
301 LPGPPGERG PGSRGFPDAD GVAGPKGPSG ERGAPGPAGP KGSPGEAGRP GEAGLPGAAG
361 LTGSPGSPGP DGKTGPPGPA QDGRPPGAG PPGARGQAGV MGFPKPGTA GEPGKAGERG
421 LPGPPGAVGP AGKDGEAGAQ GAPGAPGAG ERGEQGPAGS PGFQGLPGA GPPGEAGKPG
481 EQGVPGDLGA PGPSGARGER GFPGERGVQG PPGAPPRGN NGAPGNDGAK GDTGAPGAPG
541 SQGAPGLQGM PGERGAAGLP GPKGDRGDAG PKGADGSPGK DGARGLTGP I GPPLE

fig-11

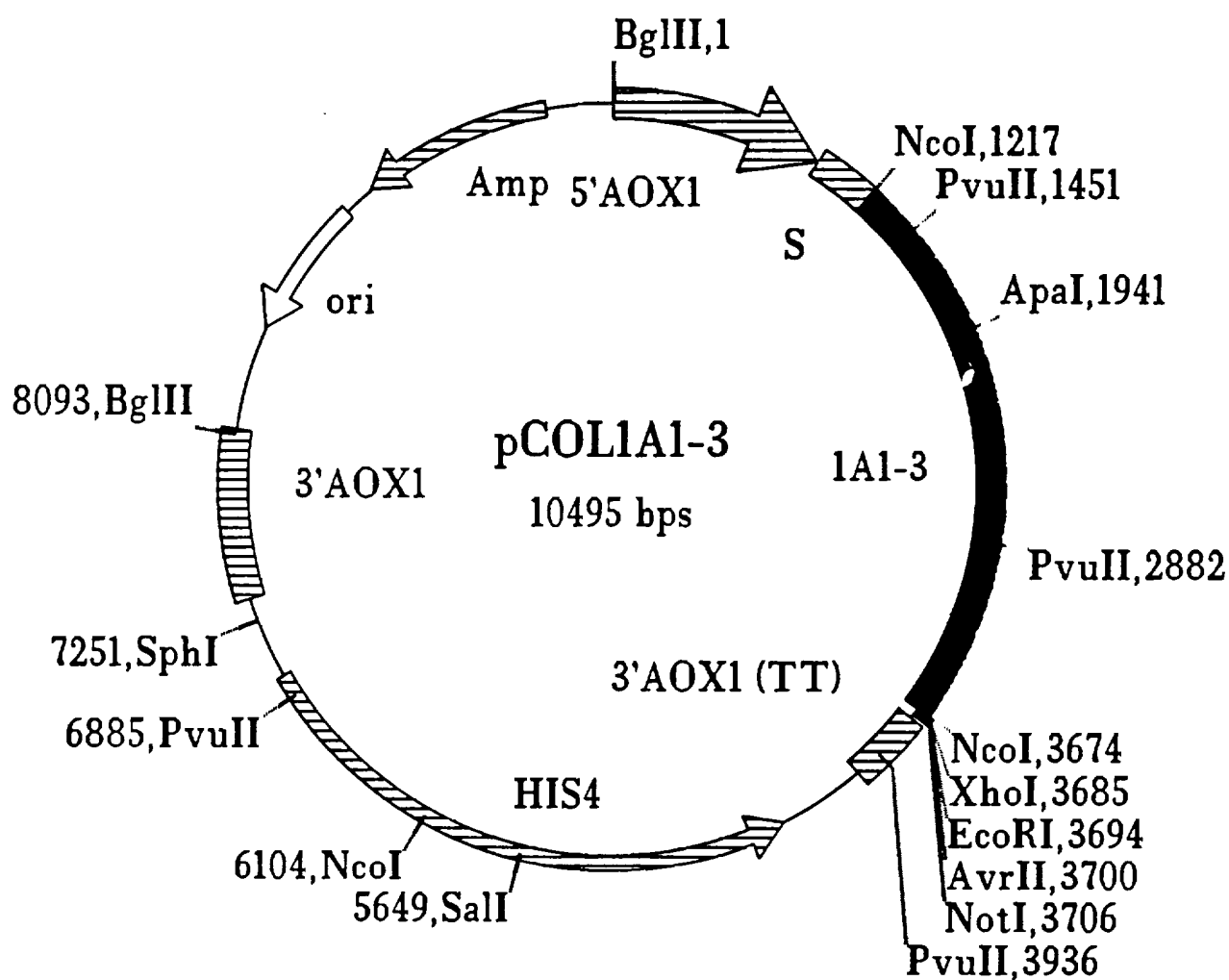


Fig. 12. Verwachte COL1A1-3* sequentie

1 PMGPSGRGL PGPPGAPGQ GFQPPGEPG EPGSGPMGP RGPPGPPGKN GDDGEAGKPG
 61 RPERGPPGP QGARGLPGTA GLPGMKHHRG FSLDGAKGD AGPAGPKGEP GSPGENGAPG
 121 QMGPRGLPGE RGRPGPPGTA GARGNDGAVG AAGPPGPTGP TGPPGFFGAV GAKGEAGPQG
 181 ARGSEGQQV RGEPPPGPA GAAGPAGNPG ADGQPGAKGA NGAPGIAGAP GFPGARGPSG
 241 PQGPSGPPGP KNSGEPGAP GNKGTGAKG EPGATGVQGP PGPAGEEGKR GARGEPPSG
 301 LPGPPGERGG PGSRGFPGAD GVAGPKGPSG ERGAPGPAGP KGSPGEAGRP GEAGLPGAKG
 361 LTGSPGSPGP DGKTGPPGPA GQDGRPGPAG PPGARGQAGV MGFPGBKGTG GEPAKAGERG
 421 LPGPPGAVGP AGKDGEAGAQ GAPGPAGPAG ERGEQGPAGS PGFQGLPGPA GPPGEAGKPG
 481 EQGVPGDLGA PGPSGARGER GFPPGERGVQG PPGPAGPRGN NGAPGNDGAK GDTGAPGAPG
 541 SQGAPGLQGM PGERGAAGLP GPKGDRGDAG PKGADGSPGK DGARGLTGPI GPPGPAGAPG
 601 DKGEAGPSGP PGPTGARGAP GDRGEAGPPG PAGFAGPPGA DGQPGAKGEP GDTGVKGDAG
 661 PPGPAGPAGP PGIGNVGAP GPKGPRGAAG PPGATGFPGA AGRVGPPPGS GNAGPPGPPG
 721 PVGKEGKGP RGETGPAGRP GEVGP GPPG PAGEKGPSA DGAGSPGTP GPQGIAGQRG
 781 WGLPGQRGE RGFPGLPGPS GEPGKQGPSG SSGERGPPGP MG

Fig. 13. 'MGPR' sequentie in de verwachte sequentie van COL1A1-2

1 PMGPSGPRGL PGPPGAPGPQ GFQPPGEPG EPGSGPMGP RGPPGPPGKN GDDGEAGKPG
 61 RPERGPPGP QGARGLPGTA GLPGMKHHRG FSGLDGAKGD AGPAGPKGEP GSPGENGAPG
 121 QMGRGLPGE RGRGPPGTA GARGNDGAVG AAGPPGPTGP TGPPGFPGAV GAKGEAGPQG
 181 ARGSEGQGV RGEPPGPPGA GAAGPAGNPG ADGQPGAKGA NGAPGIAGAP GFPGARGPSG
 241 PQGPSGPPGP KNSGEPGAP GNKGDGAKG EPGATGVQGP PGPAGEEGKR GARGEPPSG
 301 LPGPPGERGG PGSRGFPGAD GVAGPKGPSG ERGAPGPAGP KGSPGEAGRP GEAGLPGAKG
 361 LTGSPGSPG DGKTGPPGPA GQDGRPGPAG PPGARGQAGV MGFPGPKGTA GEPGKAGERG
 421 LPGPPGAVGP AGKDGEAGAQ GAPGAPGAG ERGEQGPAGS PGFQGLPGPA GPPGEAGKPG
 481 EQGVPGDLGA PGPSGARGER GFPGERGVQG PPGAPPRGN NGAPNDGAK GDTGAPGAPG
 541 SQGAPGLQGM PGERGAAGLP GPKGDRGDAG PKGADGSPGK DGARGLTGPI GPPL

- *1. De enkelvoudig onderstreepte sequenties komen overeen met de N-terminale sequenties die zijn verkregen voor de COL1A1-1-fragmenten.
- *2. De MPPR-sequentie is dubbel onderstreept.

fig-14

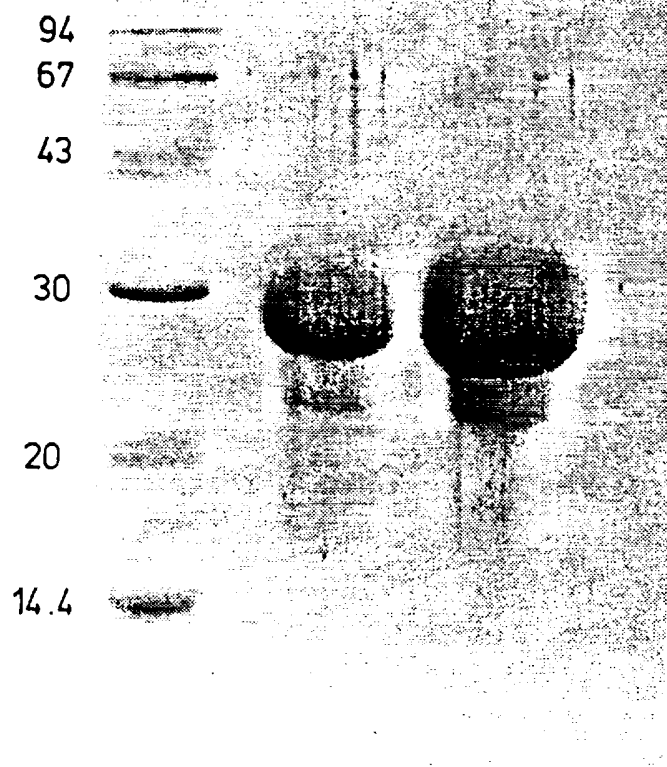
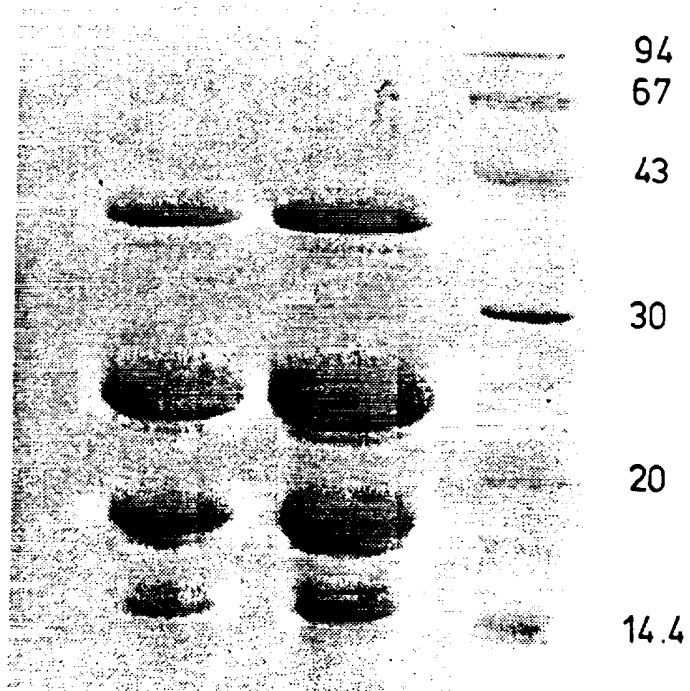


fig-15



1007908

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde N.O. 41731 TM
Nederlandse aanvrage nr. 1007908	Indieningsdatum 24 december 1997
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) FUJI PHOTO FILM B.V.	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type --	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 30618 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven) Volgens de internationale classificatie (IPC) Int.Cl. ⁶ : G 03 C 1/005, G 03 C 1/047, C 07 K 14/78	
II. ONDERZOChte GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int.Cl. ⁶ :	G 03 C, C 07 K
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. ☐ GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. ☐ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)	

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007908

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 6 G03C1/005 G03C1/047 C07K14/78

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 6 G03C C07K

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	US 5 580 712 A (KEEVERT, JR. ET AL.) 3 December 1996 zie conclusies 9,18,20-23; voorbeelden 2,3 ---	1-38,51, 52
X	US 5 670 616 A (WEBER ET AL.) 23 September 1997 zie voorbeeld 3 ---	1-38,51, 52
A	WO 97 38710 A (FIBROGEN INC ;ACADEMY OF FINLAND (FI); KIVIRIKKI KARI I (FI); PIHL) 23 Oktober 1997 zie conclusies; voorbeelden ---	39-50
A	FR 2 685 347 A (UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR) 25 Juni 1993 in de aanvraag genoemd zie conclusies --- -/-	39-50

☒ Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

☒ Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

- *A* document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang
- *E* eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna
- *L* document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publikatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven
- *O* document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel
- *P* document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

- *T* later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt
- *X* document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten
- *Y* document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt
- *Z* document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

14 September 1998

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Buscha, A

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007908

C. (Vervolg): VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	WO 93 10154 A (PROTEIN POLYMER TECH INC) 27 Mei 1993 in de aanvraag genoemd zie conclusies; figuren ---	39-50
A	WO 93 07889 A (UNIV JEFFERSON) 29 April 1993 in de aanvraag genoemd zie bladzijde 1 ---	39-50
A	WO 97 14431 A (COLLAGEN CORP ; GENOTYPES INC (US)) 24 April 1997 zie conclusies -----	39-50

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007908

In het rapport genoemd octrooi geschrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)		Datum van publicatie
US 5580712	A	03-12-1996	GEEN		
US 5670616	A	23-09-1997	US 5801045	A	01-09-1998
WO 9738710	A	23-10-1997	AU 3056697	A	07-11-1997
FR 2685347	A	25-06-1993	GEEN		
WO 9310154	A	27-05-1993	AU 675056	B	23-01-1997
			AU 3064692	A	15-06-1993
			CA 2123316	A	27-05-1993
			EP 0670848	A	13-09-1995
			JP 7501443	T	16-02-1995
			US 5773249	A	30-06-1998
			US 5496712	A	05-03-1996
WO 9307889	A	29-04-1993	AU 680606	B	07-08-1997
			AU 3055592	A	21-05-1993
			AU 4441497	A	12-02-1998
			CA 2121698	A	29-04-1993
			EP 0625048	A	23-11-1994
			JP 7501939	T	02-03-1995
			US 5405757	A	11-04-1995
			US 5593859	A	14-01-1997
WO 9714431	A	24-04-1997	AU 7450496	A	07-05-1997