



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

**Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării**

(21) Nr. cerere: **94-01956**

(22) Data de depozit: **28.05.1993**

(30) Prioritate: **08.06.1992 US 07/895.300;**

(41) Data publicării cererii:

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.11.2001 BOPI nr. **11/2001**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 93 / 05136 28.05.1993**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 93/25670 23.12.1993**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4065355; WO 90/07572

(71) Solicitant: **GENENTECH INC., SOUTH SAN FRANCISCO CALIFORNIA, US;**

(73) Titular: **GENENTECH INC., SOUTH SAN FRANCISCO CALIFORNIA, US;**

(72) Inventatori: **FRENZ JOHN, MILLBRAE 94030, US; SLIWKOWSKI MARY B., SAN CARLOS 94070, US; SHIRE STEVEN J., BELMONT 94002, US;**

(74) Mandatar: **S.C. ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI;**

(54) **DNAZĂ UMANĂ, PURIFICATĂ, PROCEDEU PENTRU
PREPARAREA ACESTEIA ȘI COMPOZIȚIE CARE O CONȚINE**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la DNaza umană, purificată, având secvența de aminoacizi prezentată în fig. 1, în care restul Asn, corespunzător poziției Asn 74 din DNaza umană, este deamidat sau nedeamidat, precum și variatele acesteia, rezultate în urma mutațiilor punctiforme, având activitate de hidrolizare DNA enzimatică, la un procedeu pentru prepararea DNazei umane, purificate, deamidate la restul Asn 74, dintr-un amestec

de DNază umană, deamidată și ne-deamidată, prin separare pe o rășină schimbătoare de cationi cu tentacule sau cu o rășină heparin mobilizată sau cu o rășină DNA analoagă, nehidrolizabilă, mobilizată, și la o compoziție de DNază umană, purificată.

Revendicări: 6
Figuri: 9

RO 117188 B1



Invenția se referă la DNaza umană purificată, la un procedeu pentru prepararea DNazei umane purificate deamidate la restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă sau a DNazei umane purificate nedeamidate la restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă dintr-un amestec al acestora și la o compoziție farmaceutică cuprinzând DNaza purificată care poate fi administrată pacienților care suferă de afecțiuni pulmonare.

Este cunoscut din lucrarea lui Liao și colab. *J.Biol.Chem* 24:891489 (1973) secvența de aminoacizi completă pentru deoxiribonucleaza de mamifere.

Deoxiribonucleaza este o fosfodiesterază capabilă să hidrolizeze acidul polideoxiribonucleic și a fost purificată la diferite grade de puritate din diferitele specii.

Deoxiribonucleaza a fost folosită, printre altele, în scopuri terapeutice. Principala ei utilizare terapeutică a fost de a reduce viscoelasticitatea secrețiilor pulmonare în boli ca, pneumonia și fibroza chistică, ajutând prin aceasta la eliberarea căilor respiratorii. Vezi, de exemplu, Lourenco, și alții, *Arch.Intern.Med.*142: 2299(1982); Shak și alții, *Proc.Nat.Acad.Sci.* 87:9188(1990), Hubbard, și alții, *New Engl.J.Med.*326:812(1992).

DNA-ul ce codifică DNaza umană I (acid deoxiribonucleic) a fost izolat și secvențializat, iar DNA-ul exprimat în celulele gazdă recombinante, făcând astfel posibilă producerea de deoxiribonuclează umană în cantități utilizabile comercial, vezi, de exemplu, Shak, și alții, *Proc.Nat.Acad.Sci.*87: 9188-9192(1990). Deoxiribonuclează umană recombinată (rhDNase) s-a constatat a fi utilizată clinic, în special, în forma ei purificată, astfel, încât deoxiribonucleaza să fie liberă de proteaze și alte proteine cu care ea este în mod obișnuit asociată în natură. Vezi, de exemplu, Hubbard, și alții, *New Engl.J.Med.*326:812(1992).

Mijloacele și metodele prin care deoxiribonucleaza umană poate fi obținută în formă eficientă, din punct de vedere farmaceutic, este descrisă în cererea de brevet descrisă mai înainte. Diferite metode specifice pentru purificarea deoxiribonucleazei sunt cunoscute de către cei care lucrează în domeniu. Vezi, de exemplu, Khouw și colab, în **US 4065355** (datat 27 Decembrie 1977); Markey, *FEBS Letters* 167:155(1984); Nefsky, și colab., *Eur.J.Biochem.* 179:215(1989).

Cu toate că nu a fost apreciată la timpul la care a fost înregistrată cererea de brevet la care se face referință mai sus, produsul deoxiribonuclează obținut din culturile celulelor gazdă recombinante cuprind, în mod general, un amestec de forme deamidate și ne-deamidate ale deoxiribonucleazei. Existența formelor deamidate ale deoxiribonucleazei au rămas neapreciate cu toate că fenomenul de deamidare a reziduurilor de asparagină și glutamină în unele proteine este cunoscut. Vezi, de exemplu Eipper, și colab., *Ann.Rev.Physiol.*50: 333(1988); Kossiacoff, *Science* 240:199(1981); Bradbury, și colab., *Trends in Biochem. Sci.* 16: 112(1991); și Wright, *Protein Engineering* 4: 283(1991).

Problema, pe care o rezolvă invenția, este de a produce DNaza umană purificată printr-un procedeu specific și de a prezenta o compoziție farmaceutică cu DNaza umană purificată.

DNaza umană purificată având secvența de aminoacizi prezentată, în fig. 1, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă este deamidat sau ne-deamidat, precum și variante ale acestora rezultate în urma mutațiilor punctiforme (adiție, deleție, inserție), având activitate de hidrolizare DNA enzimatică.

Procedeu pentru prepararea DNazei umane purificate deamidate la restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă sau a DNazei umane purificate ne-deamidate, la restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă, dintr-un amestec al acestora, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, acesta constă în separarea amestecului menționat cu o rășină schimbătoare de cationi tentaculară sau cu o rășină heparin imobilizată sau cu o rășină DNA analogă, nehidrolizabilă, imobilizată. 50

Compoziția farmaceutică, conform invenției, conține DNază umană deamidată într-o cantitate mai mică, de aproximativ 25%, în greutate, din DNaza totală în compoziție. 55

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- modificare enzimatică a vascoelasticității mucusului;
- deoxiribonucleaza umană purificată ne-deamidată este pe deplin activă din punct de vedere enzimatic; 60

Prezenta invenție confirmă, după faptul neapreciat anterior, că deoxiribonucleaza umană recombinantă poate exista ca un amestec de forme deamidate sau ne-deamidate. Utilizând metodele din prezenta invenție s-a găsit că deoxiribonucleaza umană deamidată este mai puțin activă, din punct de vedere enzimatic, decât deoxiribonucleaza umană ne-deamidată. Astfel, prezența deoxiribonucleazei deamidate și a deoxiribonucleazei ne-deamidate împreună în amestec și posibilitatea unei deamidări ulterioare, așa cum a fost găsit că are loc la depozitarea *in vitro* a preparatelor de deoxiribonuclează umană, poate complica eforturile de a asigura existența unei uniformități consecvente în produsul deoxiribonuclează care este administrat clinic. Ca urmare, întrucât existența și caracteristicile deoxiribonucleazei deamidate nu erau cunoscute anterior prezentei invenții, metodele pentru identificarea deoxiribonucleazei deamidate și separarea acesteia din preparatele de deoxiribonuclează în care ea poate fi găsită erau neevidente la data la care această invenție a fost realizată. 65 70

Prezenta invenție este direcționată către procedeele de separare a formelor de deoxiribonuclează umană deamidată și ne-deamidată dintr-un amestec al acestora. Acest procedeu cuprinde în exemplele de realizare preferate separarea amestecului prin cromatografie utilizând o rășină sau un alt mediu suport, care este legat la un polimer cationic cum ar fi, heparin sau un analog ne-hidrolizabil al acidului deoxiribonucleic (DNA) sau prin cromatografia pe așa-numita rășină schimbătoare de ioni tentaculară. Prezenta invenție este direcționată, de asemenea, către utilizarea acestor metode cromatografice cu deoxiribonucleaze ne-umane cum ar fi, deoxiribonucleaza de bovine. 75 80

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la deoxiribonucleaza deamidată umană ca produs purificat, în mod substanțial liber de deoxiribonuclează umană ne-deamidată. 85

Invenția se referă, de asemenea, la deoxiribonuclează umană ne-deamidată ca produs purificat, în mod substanțial liber de deoxiribonuclează umană deamidată. S-a găsit aici că deoxiribonucleaza umană purificată ne-amidată este pe deplin activă din punct de vedere enzimatic în comparație cu deoxiribonucleaza umană deamidată. 90

Prezenta invenție este direcționată, de asemenea, către compoziții farmaceutice constând, fie din deoxiribonuclează umană deamidată purificată, fie din deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată ca principiu activ, în mod opțional, împreună cu un excipient acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

95

Invenția se referă, de asemenea, la o metodă cuprinzând administrarea unei cantități eficiente, din punct de vedere terapeutic, de deoxiribonuclează umană deamidată purificată sau de deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată, pentru tratamentul, unui pacient, de exemplu, cei având o acumulare de material vâscos, conținând DNA. Administrarea unei asemenea deoxiribonucleazei purificate este efectuată

100

în mod preferabil prin inhalare directă în plămâni.

Invenția este în mod particular direcționată către o metodă de tratare a pacientului având o boală pulmonară cum ar fi, bronșita cronică, fibroza chistică sau emfizen, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente din punct de vedere terapeutic de deoxiribonuclează umană deamidată purificată, preferabil, direct în tractul respirator.

105

Invenția este direcționată, de asemenea, către compoziții farmaceutice cuprinzând deoxiribonucleaza umană ne-deamidată, care este dispusă într-o fiolă din masă plastică, în mod opțional, în prezența unui excipient acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

110

Făcând o descriere detaliată a invenției trebuie arătat că prin termenul "deoxiribonuclează umană" se înțelege aici o polipeptidă având secvența de aminoacizi a deoxiribonucleazei umane mature I, înfățișată mai înainte în fig. 1, precum și variantele de secvențe de aminoacizi a acesteia (incluzând variantele alelice) care sunt active din punct de vedere enzimatic în hidroliza DNA. Astfel termenul "DNase umană" denotă aici o definiție largă a acelor materiale prezentate și preparate în cererile de brevet descrise mai înainte.

115

Termenul "DNase umană" cuprinde în mod necesar deoxiribonuclează umană nativă matură având un reziduu de asparagină (Asn) la poziția 74 a aminoacizilor din polipeptidă. Această asparagină s-a găsit aici a fi susceptibilă la deamidare, care deamidare poate produce un amestec al formelor deaminată și ne-deamidată ale deoxiribonucleazei umane. În locul unui reziduu de aminoacid Asn la poziția 74, deoxiribonucleaza deamidată are un reziduu de acid aspartic (Asp) sau izo-aspartic (izo-Asp (vezi fig. 4)).

120

Termenul "DNază umană deamidată", așa cum este utilizat aici, înseamnă astfel deoxiribonuclează umană care este deamidată la reziduul de asparagină din poziția 74 a secvenței de amino acizi a deoxiribonucleazei umane native mature. S-a găsit că deoxiribonucleaza umană deamidată poate apare în timpul producerii de deoxiribonuclează umană prin mijloace recombinante și poate fi găsită în preparatele de oxiribonuclează umană obținute din celulele gazdă recombinante. În mod suplimentar, deoxiribonucleazele umane deamidate pot apare la depozitarea *in vitro* a deoxiribonucleazei umane ne-deamidate.

125

130

Cu toate că reziduul de asparagină la poziția 7 în secvența de aminoacizi a deoxiribonucleazei umane native mature poate fi, de asemenea, deamidat, în plus față de reziduul de asparagină la poziția aminoacidului 74, asemenea deoxiribonuclează dublu deamidată, a fost găsită a fi inactivă din punct de vedere enzimatic.

135

Termenul de "amestec" așa cum este utilizat aici cu referire la preparate ale deoxiribonucleazei umane înseamnă prezența, atât a formei de deoxiribonuclează umană deamidată, cât și a celei ne-deamidate. S-a găsit, de exemplu, că în preparatele de deoxiribonuclează umană obținute din expresia recombinantă, aproximativ 50 până la 80% sau chiar mai mult din deoxiribonucleaza umană este deamidată.

Termenul "DNază umană deamidată purificată" așa cum este utilizat aici înseamnă deoxiribonuclează umană deamidată care este în mod substanțial liberă de deoxiribonuclează umană ne-deamidată. Cu alte cuvinte, deoxiribonucleaza umană ne-deamidată cuprinde, mai puțin, de aproximativ 10, preferabil, mai puțin, de aproximativ 5%, și, cel mai preferabil, mai puțin, de aproximativ 1%, în greutate, din totalul deoxiribonucleazei din compoziția de deoxiribonuclează deamidată umană purificată. 140 145

Termenul "DNază umană ne-deamidată purificată" așa cum este utilizat aici înseamnă deoxiribonuclează umană ne-deamidată care este în mod substanțial liberă de deoxiribonuclează umană deamidată. Cu alte cuvinte deoxiribonucleaza umană deamidată cuprinde, mai puțin, de aproximativ 25, preferabil, mai puțin, de aproximativ 5% și, opțional, mai puțin, de aproximativ 1%, în greutate, din totalul deoxiribonucleazei din compoziția de deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată. 150

Prin termenul "excipient" menționat aici se înțelege un material acceptabil din punct de vedere farmaceutic care este utilizat împreună cu deoxiribonucleaza, pentru administrarea adecvată și cu succes a deoxiribonucleazei la un pacient. Excipientele adecvate sunt bine cunoscute de către cei care lucrează în domeniu și sunt descrise, de exemplu, în *Physicians Desk Reference*, în *Merck Index* și *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 155

Formularea preferată pentru deoxiribonucleaza umană este o soluție apoasă tamponată sau netamponată, și, preferabil, este o soluție izotonică de sare, ca, de exemplu, soluție 150 mM clorură de sodiu conținând 1,0 mM clorură de calciu, la pH= 7. Aceste soluții sunt, în mod special, adecvate pentru utilizare în pulverizatoare disponibile comercial, incluzând pulverizatoarele cu jet și pulverizatoarele ultrasonice utilizate pentru administrare, de exemplu, direct în căile respiratorii sau în plămânii unui pacient cu afecțiuni. Se face referință la cererile de brevet identificate mai înainte, pentru detalii suplimentare privind modul cum deoxiribonucleaza umană poate fi formulată și administrată în vederea unei utilizări eficiente. 160 165

Prin termenul "cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic" aici se înțelege dozaje, de la aproximativ 1 μ g până la aproximativ 100 mg de deoxiribonuclează umană per kilogram corp administrată în compoziții farmaceutice, așa cum sunt descrise aici. Cantitatea eficientă din punct de vedere terapeutic de deoxiribonuclează depinde, de exemplu, de obiectivele terapeutice, de calea de administrare și de starea pacientului. În mod corespunzător, este necesar pentru medicul terapeut să titreze dozajul și să modifice calea de administrare așa cum este necesar, pentru a se obține efectul terapeutic optim. Având în vedere diferențele dintre activitatea enzimatică a deoxiribonucleazei deamidate și ne-deamidate descrise aici, este posibil ca, cantitatea de deoxiribonuclează ne-deamidată purificată necesară pentru a realiza efectul terapeutic, să fie mai mică decât cantitatea de deoxiribonuclează umană deamidată purificată sau un amestec din cele două forme necesar pentru a realiza același efect în aceleași condiții. 170 175

Deoxiribonucleaza purificată aici, în mod special, forma ne-deamidată, este folosită pentru modificarea enzimatică a vâscoelasticității mucusului. Astfel de deoxiribonuclează umană purificată este, în mod special, utilă pentru tratamentul pacienților cu boli pulmonare care prezintă secreții anormale, vâscoase, purulente și stări cum ar fi, boli bronho-pulmonare acute sau cronice, incluzând pneumonia infecțioasă, bronșite sau traheo-bronșite, bronhiectasis, fibroză chistică, astm, tuberculoză și 180 185

infecții fungice. Pentru asemenea terapii, o soluție sau un preparat uscat fin divizat de deoxiribonuclează umană deamidată purificată sau deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată este introdusă prin mijloace convenționale în bronhii, de exemplu, prin aerosolizare.

190 După clonarea cu succes și expresia deoxiribonucleazei umane în celule gazdă recombinante, s-a descoperit în urma unei cercetări serioase că, produsul deoxiribonuclează obținut din asemenea expresii recombinante există, în general, sub forma unui amestec de componente nedefinite până în prezent. În particular, analiza de focalizare isoelectrică (IEF) a deoxiribonucleazei umane purificate din culturi de celule
195 recombinante din ovare de hamster chinezesc (CHO) a scos în evidență un model complex de specii de deoxiribonuclează. Diferitele specii de deoxiribonuclează au fost determinate ca fiind rezultate din mai multe modificări post-tranlaționale a deoxiribonucleazei, incluzând deamidarea.

Au fost utilizate două teste pentru a determina prezența și extinderea deoxiribonucleazei în asemenea preparate. Una din metode reclamă digestia triptică a preparatului de pornire a deoxiribonucleazei și analiza peptidelor rezultate prin HPLC în faza inversă. În această metodă, cantitatea de deoxiribonuclează deamidată în preparatul de pornire a fost determinată prin măsurarea cantităților din șase peptide triptice care indică deamidarea.

200 O altă metodă implică cromatografia preparatului de pornire a deoxiribonucleazei pe o coloană schimbătoare de cationi tentaculară (TCX). S-a descoperit că, coloana TCX este capabilă să separe deoxiribonucleaza umană deamidată și deoxiribonucleaza umană ne-deamidată, astfel, încât fiecare formă de deoxiribonuclează ar putea fi separată în mod eficient de cealaltă și obținută în forma purificată. În această
210 metodă cantitatea de deoxiribonuclează deamidată și ne-deamidată, în preparatul de pornire, a fost determinată prin măsurarea pe diagrame a ariei vârfurilor care corespund la formele separate de deoxiribonuclează.

Cu toate că aceste două metode sunt aproximativ la fel de eficiente în determinarea și stabilirea cantității de deoxiribonuclează deamidată, metoda TCX este în mod
215 special eficientă, necesitând de departe mai puțin timp și volum de muncă, decât cealaltă metodă. Mai mult decât atât, cromatografia TCX asigură un mijloc pentru separarea formelor de deoxiribonuclează deamidate și ne-deamidate, în timp ce rășinile schimbătoare de cationi convenționale și diferite alte rășini cromatografice care au fost analizate nu sunt capabile de o asemenea separare.

220 Principiul general al cromatografiei TCX a fost descris, de Miller, *J.Chromatography* 510: 133(1990); Janzen, și colab., *J.Chromatography* 522: 77(1990); și Hearn și colab., *J.Chromatography* 548:117(1991). Fără a limita invenția la un mecanism particular sau la o anumită teorie de operare, se crede că reziduul Asn-74 în deoxiribonucleaza umană, care este susceptibil de deamidare, este
225 localizată în interiorul porțiunii adâncite de legare a DNA din enzimă, prin analogie cu structura cristalină cunoscută a deoxiribonucleazei de bovine. Porțiunea adâncită de legare a DNA în formă de creștătură conține reziduuri de aminoacizi bazici (în scopul de a lega DNA) și această creștătură este accesibilă în mod aparent liganzilor din rășina schimbătoare de cationi tentaculară, dar nu și pentru liganzii mult mai scurți
230 ai rășinilor schimbătoare de cationi convenționale. În mod prezumtiv, liganzii din rășina schimbătoare de cationi, tentaculară, imită substraturile acidului nucleic natural.

Ca urmare, este de așteptat ca cromatografia de schimb activă, tentaculară, să fie utilizabilă pentru purificarea altor nucleaze, cum ar fi, ribonucleaza (RNaze) sau endonucleaze de restricție, precum și proteine de legare DNA.

În mod alternativ, separarea formelor de deoxiribonuclează deamidată și ne-deamidată ar putea fi realizată prin cromatografie, utilizând o rășină sau o altă matrice - suport conținând polimeri cationici legați covalent, cum ar fi, heparin sau un analog DNA sintetic ne-hidrolizabil. Coloanele cromatografice cu heparin imobilizat sunt disponibile comercial (de exemplu, de la Toso Haas, Montgomeryville, Pennsylvania). Analogii de DNA ne-hidrolizabili au fost descriși, de exemplu, de Spitzer și alții, *Nuc. Acid. Res.* 16:11691 (1988). O coloană pentru DNA analog ne-hidrolizabil imobilizat este preparată în mod convenabil prin sintetizarea unui astfel de analog DNA cu o grupare de aminoacid la capătul -3' al unuia sau ambelor dintre catenele lui complementare. Gruparea amino este după aceea disponibilă pentru cuplare la o coloană activată - epoxi, așa cum a fost descrisă, de exemplu, în literatura publicată de Rainin Biochemical LC Products (Woburn, Massachusetts).

Ca urmare a separării cu succes a deoxiribonucleazei umane deamidate și ne-amidate, în conformitate cu metodele din prezenta invenție, s-a găsit că deoxiribonucleaza deamidată umană are activitate enzimatică diminuată în comparație cu deoxiribonucleaza umană ne-deamidată, așa cum a fost determinată printr-un test "metil green" (MG), Kurnick, Arch. Biochem. 29: 41(1959). S-a găsit că deoxiribonucleaza umană deamidată manifestă peste jumătate din activitatea enzimatică a deoxiribonucleazei ne-deamidate. Astfel, prin combinarea deoxiribonucleazei deamidate purificate și a deoxiribonucleazei ne-deamidate purificate, din prezenta invenție, în proporții variabile, este posibil a se prepara compoziții farmaceutice de deoxiribonuclează umană având orice activitate specifică dorită în domeniul dintre activitățile specifice ale componentelor individuali, astfel, încât să fie optime, privind tratarea afecțiunilor speciale.

În continuare, se dau 5 exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1-9, care reprezintă:

- fig. 1, înfățișează secvențele de aminoacizi (SECV.ID.NR. 1) și de baze din DNA (SECV.ID.NR.2) ale deoxiribonucleazei umane I. Secvența semnalului nativ este subliniată. Codonii de inițiere potențială sunt încercuiți, iar secvența matură este pusă între paranteze;

- fig. 2, înfățișează corelarea dintre activitatea enzimatică și extinderea deamidării probelor de deoxiribonuclează umană. Activitatea specifică determinată prin normalizarea activității deoxiribonucleazei, așa cum a fost determinată printr-un test "metil green" (MG) (în unități de concentrație în raport cu o curbă standard), față de concentrația deoxiribonucleazei măsurată printr-un test imunoabsorbant de legare a enzimei (ELISA). Procentul de deamidare a fost determinat prin tratare criptică. Probele din "Ziua de recoltare" de deoxiribonuclează umană au fost purificate dintr-o cultură de celule recombinante de ovare de hamster chinezesc (CHO), exprimând DNA, care codifică deoxiribonucleaza I umană. Asemenea probe au fost luate la 3, 5, 7, 9, 11, 13 și 20 de zile după ce s-a început cultivarea. Probele de "pH ridicat" sunt probele din ziua a 13-a de deoxiribonuclează purificată, care au fost incubate *in vitro*, timp, de 2 zile, la pH=8 și, la temperatura, de 37°C. Probele privind "Stabilitatea" au fost probe de deoxiribonuclează purificată din ziua a 13-a, care au fost stocate *in vitro*, la temperatura, de 5, 25 sau 27°C, pentru diferite perioade de timp;

- fig.3, este un exemplu o cartare triptică a deoxiribonucleazei utilizată pentru determinarea extinderii deamidării. Proba arătată aici reprezintă deoxiribonuclează deamidată 65%. "mAU" indică unități de mili-absorbanță la 214 nM;

- fig.4, este o reprezentare schematică a deamidării rezidului de aspargină în poziția 74 (Asn - 74) în deoxiribonuclează umană nativă. Deamidarea convertește Asn-74, fie la acid aspartic (Asp), fie la un reziduu izo-aspartat (izo-Asp). Fiecare dintre cele 3 forme de deoxiribonuclează conduce, la digestia cu tripsină, la o pereche de peptide care indică identitatea formei particulare de deoxiribonuclează;

- fig.5, este o cromatogramă a unei probe de deoxiribonuclează umană fracționată într-o coloană schimbătoare de cationi tentaculară (TCX). Proba arătată este deoxiribonuclează deamidată 67%;

- fig.6, prezintă cartările triptice a două vârfuri de fracțiuni obținute din separarea TCX, arătată în fig. 5. Absența peptidei triptice T 6-7 din reprezentarea obținută prin digestia vârfului 2 digest indică absența deoxiribonucleazei deamidate;

- fig.7, arată cromatograme a mai multe multiplelor probe de deoxiribonuclează umană fracționate pe o coloană TCX. Proba denumită "M1 - 28 STD" este un preparat de deoxiribonuclează umană obținut dintr-o cultură de celule din ovare de hamster chinezesc (CHO) transformat cu DNA care codifică deoxiribonucleaza umană nativă. Proba notată "DNaza ASP mutant" este deoxiribonuclează, având un reziduu de acid aspartic (preferabil, decât un reziduu de aspargin) la poziția 74 a aminoacidului și care astfel, are aceeași secvență de aminoacizi ca forma Asp a deoxiribonucleazei deamidate descrisă în fig. 4. DNaza ASP mutant a fost obținută dintr-o cultură de celule transformate cu DNA, care codifică acea formă mutantă a deoxiribonucleazei umane DNA, care codifică DNaza ASP mutant a fost preparat prin mutageneză situs direcționată a DNA, care codifică deoxiribonucleaza umană nativă. Compararea cromatogramelor arată că una din formele de deoxiribonuclează umană în proba M1-28 STD eluează la separarea pe coloana TC la aceeași poziție ca DNaza Asp Mutant;

- fig.8, arată cromatogramele diferitelor probe de deoxiribonuclează umană, fracționate pe o coloană TSK - Heparin (Toso Haas, Montgomeryville, Pennsylvania). Proba denumită "12K - 8" este un preparat de deoxiribonuclează umană obținută dintr-o cultură de celule din ovare de hamster chinezesc (CHO) transformate cu DNA, care codifică deoxiribonuclează I nativă umană. Proba denumită "Standard deamidată" este deoxiribonuclează umană deamidată purificată. Proba denumită "Standard ne-deamidată" se referă la deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată. Deoxiribonucleaza umană deamidată purificată și deoxiribonucleaza umană ne-amidată purificată au fost preparate cu ajutorul cromatografiei TCX;

- fig.9 arată cromatogramele a mai multe probe de deoxiribonuclează umană fracționate pe o coloană cu un analog DNA imobilizat. Proba denumită "M1-28" este un preparat de deoxiribonuclează umană obținut dintr-o cultură de celule din ovarele de hamster chinezesc (CHO) transformate cu DNA care codifică deoxiribonucleaza umană nativă I. Proba denumită "Standard Deamidat" este deoxiribonuclează umană deamidată purificată. Proba denumită "Standard Ne-deamidat" se referă la deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată. Deoxiribonucleaza umană deamidată purificată și deoxiribonucleaza umană ne-deamidată purificată au fost preparate prin cromatografie TC. Proba denumită "DNase ASP Mutant" este deoxiribonuclează având un reziduu de acid aspartic (preferabil, decât un reziduu de aspargină) la poziția 74 a aminoacidului.

RO 117188 B1

Exemplul 1. Procedura utilizată pentru cartarea obținută în urma digestiei cu tripsină deoxiribonucleazei umane este rezumată după cum urmează:

Se aduce concentrația unui miligram de probă de deoxiribonuclează, până la 4 mg/ml prin concentrare pe un aparat Amicon Centrico - 10 sau prin diluție cu un excipient. Volumul final: 250 μ l.

330

Se adaugă 250 μ l tampon de pretratare (40 mM BisTris, 10 mM EGTA, pH=6,0) la probă. Se incubează o oră, la 37°C.

Tamponul schimbă proba într-un tampon digest (100 mM Tris, pH=8), utilizând coloana Pharmacia NAP - 5. Volumul final: 1 ml.

Se adaugă la probă 10 μ l soluție de tripsină (1 mg/ml tripsină, 1 mM acid clorhidric) și se incubează, timp, de 2 h, la 37°C.

335

Se adaugă cea de-a doua probă, de 10 μ l de soluție de tripsină la probă și se incubează suplimentar 2 h, la 37°C.

Se oprește digestia prin adăugarea a 6 μ l acid trifluoroacetic (TFA). Probele se păstrează la sau sub 5°C, până la cromatografie.

340

Se separă amestecul de peptidă prin HPLC în următoarele condiții:

Coloană: Nucleozil C 18, 5 μ m, 100 Å, 2,0 x 150 mm (Alltech, Co., Deerfield, Illinois). Temperatura coloanei: 40°C. Eluent A: 0,12% TFA în apă. Eluent B: 0,10% TFA în acetonitril.

Profilul gradientului:

345

Timp (min)	%A	%B
0	100	0
5	100	0
65	40	60
69	5	95
70	5	95

350

Debit: 0,25 ml/min. Volumul de injecție a probei 250 μ l.

Timpul de reechilibrare a coloanei post-operatoriu, la 100% A: 20 min.

355

Temperatura compartimentului auto-probă: 5°C.

Detecția: Absorbanță, la 214 și 280 nm.

Se identifică peptidele triptice T7, (D)T7, T7-8, (D)T 7-8, T6-7-8 și T6-7 prin timpul de reținere în comparație cu cel standard.

Integrarea cromatogramei obținute, la 280 nm: Se verifică calitatea integrării prin inspectarea liniei de bază și separarea vârfurilor de eluție apropiată. O atenție specială trebuie dată peptidelor cu eluție timpurie T7 și (D)T7, care pot să nu fie bine redizolvate.

360

Se normalizează ariile vârfurilor a celor șase peptide raportate la conținutul de tirozină. Peptidele T7, (D)T7, T7-8, și (D)T7-8 conțin fiecare, câte un singur reziduu Tyr, în timp ce T6-7-8 și T6-7 conțin trei reziduri Tyr. Se calculează proporția speciilor deamidate bazate pe normalizarea ariilor vârfurilor (D)T7, (D) T7-8, T6-7-8 și T6-7 raportate la ariile totale normalizate ale vârfurilor a celor șase peptide.

365

Un miligram de deoxiribonuclează într-un volum, de 250 μ l este necesar pentru a utiliza cu acuratețe metoda de cartare triptică pentru determinarea deoxiribonucleazei deamidate, în conformitate cu procedura schițată mai înainte. Prin urmare, prepararea probei inițiale pentru această metodă necesită, fie concentrarea, fie diluția probei pentru a obține acest rezultat. Deoxiribonucleaza în prezența calciului este puternic rezistentă la proteaze, incluzând tripsina. Prin urmare, următoarea fază în procedură este îndepărtarea parțială a ionilor de calciu prin tratare cu acid[etilen-bis(oxietilennitrilo)]tetraacetic (EDTA).

Supra-tratarea cu EDTA poate denatura și agrega deoxiribonucleaza, astfel, încât această fază trebuie condusă cu grijă. Proba tratată cu EDTA într-un volum, de 0,5 ml este apoi schimbată într-un mililitru de tampon de digestie, se adaugă tripsină și proba este incubată, la temperatura, de 37°C, timp, de 2 h. Cea de-a doua porție de tripsină este adăugată după aceea, iar proba este incubată suplimentar, timp, de 2 h. Digestia este oprită prin acidifiere și proba este fie păstrată pentru o analiză ulterioară sau încărcată direct în coloana HPLC.

250 μ l (250 μ g) de amestec de peptide rezultate din digestia cu tripsină este separat într-o coloană HPLC cu fază inversă, în conformitate cu condițiile schițate mai înainte. O cartare cu tripsină tipică a deoxiribonucleazei umane este arătată, în fig. 3. HPLC a fost realizat cu un model Hewlett - Packard 1090 M HPLC. Efluentul coloanei a fost monitorizat simultan, la 214 și 280 nm, prin intermediul unui detector cu diodă ceea ce reprezintă o caracteristică a acestui instrument. Întrucât, porțiunea de început a cartării peptidei este critică pentru cuantificarea deoxiribonucleazei deamidate, așa cum este descris mai înainte, alte instrumente cu gradient de întârziere mai mare și alte volume extra-coloană ar putea să nu fie potrivite pentru această analiză. Fiecare analiză, conform acestei proceduri, necesită 70 min, pentru separarea gradientului și 20 min, pentru reechilibrarea coloanei pentru o durată totală a ciclului HPLC, de 90 min. Analiza rațională și interpretarea integrării vârfului pentru determinarea deoxiribonucleazei deamidate într-o probă sunt descrise mai jos.

Deamidarea deoxiribonucleazei umane decurge cel puțin la reziduul asparaginic care este prezent în poziția aminoacidului 74 (Asn 74) în deoxiribonuclează umană matură nativă. Asn - 74 este la capătul C - terminal a situsului de clivare sub acțiunea trisinei la reziduul argininic la poziția 73 a amino acidului (Arg - 73), așa cum este arătat în lista peptidelor triptice ce se așteaptă a fi obținute din deoxiribonuclează umană arătate în tabelul I:

Tabelul I

Peptide care se așteaptă a fi produse prin digestia deoxiribonucleazei umane mature, cu trepsina

ID	Reziduuri	Secvența de amino acid a peptidelor
T1	1 - 2	LK
T2	3 - 15	IAAFNIQTFGETK (SECV.ID.NR.3)
T3	16 - 31	MSNATLVSYIVQILSR (SECV.ID.NR.4)
T4	32 - 41	YDIALVQEVVR (SECV.ID.NR.5)

Tabelul I (continuare)

ID	Reziduuri	Secvența de amino acid a peptidelor
T5	42 - 50	DSHLTAVGK (SECV.ID.NR.6)
T6	51 - 73	LLDNLNQDAPDTYHYVVSEPLGR (SECV.ID.NR.7)
T7	74 - 77	NSYK (SECV.ID.NR.8)
T8	78 - 79	ER
T9	80 - 111	YLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFN R (SECV.ID.NR.9)
T10	112 - 117	EPAIVR (SECV.ID.NR.10)
T11	118 - 121	FFSR (SECV.ID.NR.11)
T12	122 - 126	FTEVR (SECV.ID.NR.12)
T13	127 - 157	EFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEK (SECV.ID.NR.13)
T14	158 - 185	WGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIR (SECV.ID.NR.14)
T15	186 - 213	LWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAAYDR (SECV.ID.NR.15)
T16	214 - 222	IVVAGMLLR (SECV.ID.NR.16)
T17	223 - 260	GAWVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYP VEVMLK (SECV.ID.NR.17)

În locul rezidului Asn (notat cu o singură literă "N"), la rezidul 74 din deoxiribonucleaza umană ne-deamidată nativă, deoxiribonuclează umană deamidată are, fie un reziduu Asp, fie un reziduu iso-Asp, cum este arătat în fig. 4. Iso-Asp este o formă izomerică, *beta*-amino acid a acidului aspartic. Legătura peptidică dintre Arg-73 și iso-Asp este rezistentă la separarea cu tripsină, astfel, încât deoxiribonucleaza deamidată conduce la o peptidă triptică caracteristică conținând reziduuri 51 - 77 și denumită T6-7, întrucât ea este o peptidă conjugată T6 și T7. În condițiile utilizate pentru cartarea triptică, legătura peptidică Arg-73-Asn-74 din deoxiribonucleaza umană ne-deamidată și legătura peptidică Arg-73-Asp-74 în forma Asp a deoxiribonucleazei umane deamidate sunt rupte de către tripsină. Prin urmare, deoxiribonucleaza ne-deamidată este indicată în cartarea triptică prin prezența peptidei T7 arătată în tabelul I, în timp ce forma Asp - 74 a deoxiribonucleazei deamidate este indicată în cartarea triptică prin prezența peptidei T7 deamidate, denumită (D)T7. Aceste trei peptide raportor sunt marcate în fig. 3. Din nefericire, tripsina rupe doar parțial legătura

peptidică la capătul C - terminal a T7, între reziduurile 77 și 78, astfel, încât fiecare dintre peptidele raportor T7, (D) T7 și T6 - 7 are un T - 8 conjugat, T7 - 8 (D) T7-8 și respectiv T6 - 7 - 8. Aceste șase peptide raportor trebuie să fie prin urmare luate în considerare pentru a cuantifica cantitatea de deoxiribonuclează umană deamidată prin metoda cartării triptice.

În principiu, peptidele (D)T7, (D)T7 - 8, T6 - 7 și T6 - 7 - 8 reprezintă deoxiribonucleaza umană deamidată și peptidele T7 și T7 - 8 reprezintă deoxiribonucleaza umană ne-deamidată, iar cunoașterea proporțiilor relative ale acestor peptide permite calcularea directă a extinderii deamidării într-un preparat de deoxiribonuclează. Cu scopul de a calcula fracțiunea de deoxiribonuclează deamidată din probă, este necesară cunoașterea raportului molar dintre speciile deamidate și ne-deamidate.

Există două probleme suplimentare în procedura de cartare triptică care trebuie depășite: o problemă cromatografică și o problemă de detecție. Problema cromatografică este reprezentată de faptul că peptida T2 coeluează cu T6-7, și astfel împiedică integrarea cu acuratețe a ariei vârfului acestei peptide care indică deamidarea. Această problemă poate fi depășită prin integrarea cromatogramei obținută, la 280 nm, întrucât toate cele șase peptide relevante au cel puțin un reziduu de tirozină (Tyr), și astfel, absorb puternic, la 280 nm, în timp ce, T2, care nu conține reziduuri de Tyr sau triptofan, absoarbe slab la această lungime de undă. Problema de detecție este aceea că peptidele T6 - 7 și T6 - 7 - 8 conțin fiecare câte trei reziduuri Tyr, în timp ce celelalte patru peptide conțin fiecare numai unul. Astfel, peptidele conținând T6 au o absorbție molară mai mare decât aceea pe care o au peptidele care conțin numai T7, și o simplă comparare a ariilor vârfului ar duce la o supraestimare în ceea ce privește conținutul de specii deamidate din probă. Această problemă este depășită prin normalizarea ariilor vârfului celor șase peptide în ceea ce privește numărul de reziduuri Tyr din peptide. Normalizarea ariilor vârfului în acest mod conduce la faptul că toate reziduurile de tirozină în fiecare din peptide este într-un mediu chimic echivalent, care este probabil o bună ipoteză dacă ne referim la peptidele relativ mici cum sunt cele considerate aici. După normalizare, ariile corectate ale vârfului pentru peptide deamidate și ne-deamidate pot fi comparate pentru a ajunge la o estimare a conținutului de deoxiribonuclează deamidată și ne-amidată din probă.

Exemplul 2. Cromatografia de schimb de cationi tentaculară

Rășinile schimbătoare de cationi tentaculară (TCX), spre deosebire de rășinile schimbătoare de cationi convenționale, au liganzi poliionici legați la o suprafață de bioxid de siliciu. Liganzii coloanei LiChrospher (marcă înregistrată) 1000 SO_3^- (EM Separations, Gibbstown, New Jersey) utilizați în acest exemplu, așa cum au fost anunțați, conțin, între 25 și 50 grupări sulfopropil de-a lungul unui schelet de polietilenă, care este legat la un capăt de suprafața de silice.

Cromatograma TCX a unei probe de deoxiribonuclează umană recombinantă obținută pe o coloană LiChrospher (1000 SO_3^-) este arătată în fig. 5. Deoxiribonuclează recombinantă umană a fost purificată din culturi de celule de ovar de hamster chinezesc (CHO) transformate cu deoxiribonuclează umană codificată de DNA, și prezentată de Shak, și colab., în WO 90/07572 (publicată în 12 iulie 1990).

Cele două vârfuri obținute au fost colectate și supuse la diferite analize cu scopul de a le identifica formele de deoxiribonuclează ce diferă numai în ceea ce privește reziduu de la poziția 74 a aminoacidului. Fig. 6 arată cartările triptice a celor

două vârfuri colectate din coloana TCX, confirmând faptul că ele sunt, respectiv, formele deamidată și ne-deamidată ale deoxiribonucleazei umane. Reprezentarea triptică dezvăluie, de asemenea, faptul că ambele forme ale deoxiribonucleazei deamidate (având Asp și izo - Asp la poziția 74 a aminoacidului) sunt prezente în primul vârf obținut din separarea TCX. Tabelul II arată activitățile specifice măsurate pentru cele două vârfuri, confirmând relația dintre deamidare și activitatea specifică dedusă din corelația arătată în fig. 2, și astfel constituie în continuare un suport pentru identificarea fracțiunilor TCX. Activitatea fracțiunilor de deoxiribonuclează a fost determinată printr-un test "metil green".

Tabelul II

Activitatea fracțiunilor colectate din coloană TCX
(MG și ELISA reprezintă media de determinare a două probe)

Proba	MG ($\mu\text{g/ml}$)	ELISA ($\mu\text{g/ml}$)	Activitate specifică
Preparatul de pornire al deoxiribonucleazei umane recombinante (încărcare)	8315	7828	1,06
Vârf 1 TCX (deamidat)	85,3	119,7	0,71
Vârf 2 TCX (ne-deamidat)	149,2	99,4	1,50

O formă mutantă a deoxiribonucleazei umane, având un reziduu Asp la poziția 74 a aminoacidului, a fost produsă prin mutageneză situs direcționată a DNA care codifică deoxiribonuclează umană matură nativă. Acest mutant co-eluează cu primul vârf obținut în cromatografia de mai sus, așa cum este arătat în fig. 7.

Pentru a încărca rășina schimbătoare de cationi tentaculară LiChrospher (marcă înregistrată) 1000 SO_3^- se folosește următoarea procedură. O altă rășină schimbătoare de cationi tentaculară utilizabilă în mod similar pentru separarea formelor de deoxiribonuclează umană deamidată și nedeamidată este rășina schimbătoare de cationi tentaculară Fractogel (marcă înregistrată) (EM Separations, Gibbstown, New Jersey). LiChrospher și Fractogel sunt mărci înregistrate ale EM Industries, Inc., Hawthorne, N.Y., sau E. Merck, Darmstadt, West Germany. Formele "tari" ale rășinilor schimbătoare de cationi tentaculare (fie ale LiChrospher sau Fractogel), având o grupă funcțională SO_3^- , se pare că conduc în prezent la cele mai bune rezultate.

Exemplul 3. Procedura de umplere a coloanei HPLC pentru rășina LiChrospher (marcă înregistrată) 1000 SO_3^-

a. Materiale și echipament

1. Cartuș sticlă superperformance în pat de 1,0 cm x 5,0 cm.
2. Umplutură tampon: 10 nM acetat de sodiu, 1 mM clorură de calciu, pH până la 4,5 cu acid acetic. Filtrat prin filtru, de 0,2 μ .
3. Rezervor pentru umplutura coloanei cu o capacitate de 20 ml. (Alltech part 9501 sau echivalent).
4. Coloană din oțel inoxidabil 4,6 mm x 50 mm goală cu sinterizări tăiate, la 0,5 μ .

5. Pompă HPLC capabilă să mențină o contra presiune de 2000 psi (Model Waters 510 sau echivalent).

b. Procedura de umplere

1. Caracterizarea rășinii:

a) Se despachetează coloana de sticlă Superformance 1,0 cm x 5,0 cm (Volumul patului = 3,93 ml rășină). Se resuspendă rășina, la 20 ml într-un vas din sticlă transparentă cu capac, cu umplutura tampon a coloanei. Se aduce sub formă de suspensie uniformă și se împarte în două porții, de 2 x 10 ml. Se adaugă 10 ml de umplutură tampon a coloanei, la fiecare porție pentru a se obține o suspensie, de aproximativ 1,95 ml rășină, în 20 ml umplutură tampon.

b) Se aduce șlamul de rășină la starea unei suspensii uniforme. Se lasă să se așeze până când particulele formează un pat solid pe fundul vasului (2 - 4 h). Se toarnă cu grijă supernatantul care conține particulele fine.

c) Se adaugă 20 ml umplutură tampon la rășină și se repetă faza b). Această procedură trebuie repetată, cel puțin de patru ori, pentru a se asigura îndepărtarea tuturor particulelor fine de rășină.

2. Umplutura coloanei:

a) Se conectează coloana HPLC goală, de 4,6 x 50 mm, la rezervorul de umplutură. Se aduce rășina sub formă de măr, în 20 ml de umplutură tampon.

b) Se adaugă rășina sub formă de măr la rezervor și se acoperă repede. Se pompează umplutura tampon la o presiune care nu trebuie să depășească 2000 psi. Se ajustează debitul, astfel, încât presiunea umpluturii să rămână constantă la aproximativ 2000 psi și se lasă să curgă, timp, de 15 min, după ce presiunea s-a stabilizat. Se îndepărtează coloana și se atașează capacul de capăt. Coloana poate fi utilizată direct sau depozitată, în 0,02% azidă de sodiu.

Pentru majoritatea probelor, incluzând deoxiribonucleaza formulată, în 150 mM clorură de sodiu, nu este necesară prepararea probei înainte de injectarea probei în coloană. Coloana este echilibrată cu un tampon acetat, având pH=4,5 conținând ioni de calciu, proba este injectată și apoi coloana este eluată cu un gradient de sare. Este utilizabilă următoarea procedură pentru preparările la scară mică a formelor deamidate și ne-deamidate ale deoxiribonucleazei umane. Proportțiile ariilor vârfurilor din cromatograma rezultată sunt egale cu proporțiile deoxiribonucleazei deamidate și ne-deamidate din probă.

Faza 1

Se încarcă proba conținând până, la 150 mM clorură de sodiu și, la un pH până la 9 într-o fiolă autoproabă. Probele de fluid de cultură celulară separate necesită ajustarea pH-ului la 4,5 și centrifugare pentru îndepărtarea proteinelor care sunt insolubile în tampoanele utilizate în această procedură.

Faza 2

Se separă cele două forme ale deoxiribonucleazei cu ajutorul HPLC în următoarele condiții:

Coloană TCX LiChrospher (marcă înregistrată) 1000 SO₃ reumplută într-o coloană din oțel. Dimensiunile coloanei umplute și utilizate au fost, de 4,6 x 50 mm și 4,6 x 150 mm.

Temperatura coloanei: ambiantă.

Eluent A: 10 mM acetat de sodiu, 1 mM clorură de calciu, pH=4,5.

Eluent B: 1M clorură de sodiu în tampon A

Profilul de gradient:

Timpul (minute)	%A	%B
0	100	0
4	100	0
30	30	70
30,1	5	95
37	5	95

595

Debit: 8 ml/min (50 mm coloană), 0,5 ml/min (150 mm coloană).

Volumul de injecție a probei; până la 250 μ l.

600

Timpul de reechilibrare a coloanei după operare, la 100% A: 20 min.

Temperatura compartimentului de autoprobă: 5°C

Detectie: Absorbantă, la 280 nm.

Faza 3

Se integrează cromatograma. Se calculează proporția speciilor deamidate bazată pe aria vârfului obținut la eluarea timpurie a deoxiribonucleazei deamidate în raport cu aria totală a vârfurilor ambelor forme.

605

Cromatografia schimbului de cationi tentaculară asigură, de asemenea, un mijloc pentru separarea, pe scară mare, a formelor de deoxiribonuclează deamidată și ne-amidată. Separările la scară mare se conduc mai convenabil folosind condiții de operare simplificate la eluție, decât cele descrise mai înainte, pentru separarea analitică la scară mică a celor două forme de deoxiribonuclează. Prin urmare, separările la scară mare au fost efectuate cu schimbători de cationi tentaculari suportați pe suport Fractogel, în conformitate cu următoarea procedură, de pH eluție:

610

Se umple coloana 31,6 (1,6 cm diametru interior x 15,7 cm înălțime) cu rășină schimbătoare de cationi tentaculari Fractogel EMD SO₃ - 650 M (EM Separations, Gibbstown, New Jersey).

615

Se diafiltrează încărcătura de DNază cu tampon de echilibrare (30 mM acetat de sodiu (NaAc), 1 mM clorură de calciu (CaCl₂), 50 mM clorură de sodiu (NaCl), pH=5,0. Se concentrează prin ultrafiltrare, la un volum, de 355 ml și o concentrație, de 2,5 mg/ml.

620

Se spală coloana cu 2,5 ori volumul coloanei (CV) cu 2% hidroxid de sodiu (NaOH).

Se spală coloana cu 2,5 ori volumul coloanei (CV) cu tampon de pre-echilibrare (300 mM acetat de sodiu (NaAc), 1M clorură de sodiu (NaCl), pH=5.

625

Se spală coloana cu de 2,5 ori volumul coloanei (CV) cu tampon de echilibrare.

Se încarcă coloana cu 1 - 1,3 g de deoxiribonuclează diafiltrată/ultrafiltrată (de la faza 2). Se începe colectarea fracțiunilor efluentului coloanei după începerea încărcării cu deoxiribonuclează.

Se spală coloana cu de 5 ori volumul coloanei (CV) cu tampon de echilibrare.

630

Se spală coloana cu de 5 ori volumul coloanei tampon de spălare, având pH=5,3 (25 mM succinat, 1 mM clorură de calciu (CaCl₂), pH=5,3).

Se spală coloana cu de 10 ori volumul coloanei tampon de spălare, având pH=5,4 (25 mM succinat, 1 mM clorură de calciu, pH=5,4).

635 Se spală coloana cu de 10 ori volumul coloanei (CV) tampon de spălare, având $pH=6$ (25 mM MES, 1 mM clorură de calciu, $pH=6,0$).

Se combină fracțiunile colectate în timpul fazelor 6 - 8 pentru a face o rezervă constând în mod predominant din deoxiribonuclează deamidată. Se combină fracțiunile colectate în timpul fazei 10 pentru a face o rezervă de deoxiribonuclează ne-deamidată. Fracțiunile colectate în timpul fazei 9 conțin un amestec din cele două forme de deoxiribonuclează și pot fi recirculate.

645 Protocolul descris mai înainte reprezintă un exemplu de utilizare a unei rășini schimbătoare de cationi tentaculari pentru purificarea preparativă a celor două forme de deoxiribonuclează umană recombinantă într-o manieră care este capabilă a fi măsurată la recuperarea pe scară mare a deoxiribonucleazei purificate deamidate și purificate ne-deamidate.

Exemplul 4. *Cromatografia cu heparină și cu analogul de DNA imobilizat*

În fig. 8 cromatogramele sunt trasate pe baza analizelor pe o coloană TSK - Heparin (Toso Haas, Montgomeryville, Pensilvania) a probelor conținând, fie un amestec de forme ale deoxiribonucleazei umane deamidate și ne-deamidate, de deoxiribonuclează numai deamidată purificată, fie deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată. Coloana TSK - Heparin a fost operată în aceleași condiții ca cele descrise mai sus privind operarea coloanei TCX analitice. Cromatogramele trasate demonstrează că, coloana de heparină imobilizată descompune formele deoxiribonucleazei deamidate și ne-deamidate.

Așa cum a fost descris mai înainte, un alt mijloc de separare a formelor de deoxiribonuclează deamidată și ne-deamidată este utilizarea unei coloane conținând un analog de DNA imobilizat este rezistent la hidroliza cu deoxiribonuclează. Un exemplu a acestei încercări cu coloana cu DNA analog imobilizat implică sinteza oligonucleotidei phosphorotiate 5'-GCGCGCGCGCGCGCGCGCGC-NH₂ - 3'. Această secvență auto-complementară poate fi normalizată într-o formă dublu catenară și cuplată într-o coloană Rainin Hydropore - EP (Rainin Co, Woburn, Massachusetts). Fig. 9 arată cromatogramele trasate ale analizelor pe această coloană a probelor conținând, fie un amestec de deoxiribonuclează umană sub formă deamidată și ne-deamidată, deoxiribonuclează umană deamidată purificată, deoxiribonuclează umană ne-deamidată purificată, fie deoxiribonuclează umană mutantă purificată având un reziduu de acid aspartic (preferabil, decât un reziduu asparaginic) la poziția aminoacidului 74. Coloana este spălată pentru aceste analize cu un tampon conținând 1 mM clorură de calciu, 5 mM MES la o valoare a $pH=6$, și eluată cu un gradient linear de sare la o concentrație de 1 M clorură de sodiu, timp, de peste 20 min, la un debit, de 1 ml/min. Așa cum s-a arătat în fig. 9, în aceste condiții formele de deoxiribonuclează deamidată și ne-deamidată sunt parțial separate una de cealaltă. În plus, cele două forme izomere ale deoxiribonucleazei deamidate, care diferă la poziția 74 a aminoacidului din secvențele de deoxiribonuclează, prin faptul că, fie că au acid aspartic sau izoaspartic la această poziție, sunt, de asemenea, separate de această coloană. Astfel, un avantaj suplimentar al acestei metode cromatografice constă în aceea că, permite izolarea celor doi izomeri care apar la deamidarea deoxiribonucleazei umane.

Exemplul 5. *Depozitarea in vitro a deoxiribonucleazei umane*

680 Deoxiribonucleaza umană purificată din celulele CHO recombinante este dizolvată, la o concentrație, de 4 mg/ml într-o soluție apoasă netamponată de clorură

de sodiu 150 mM și 1 mM clorură de calciu. Probele din soluția de deoxiribonuclează rezultată au fost introduse în fiole de plastic și de sticlă. Două tipuri diferite de fiole din masă plastică sunt utilizate, una fiind confecționată din rășină plastică 20 Dupont (produsă de E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, Delaware, S.U.A.), iar cealaltă a fost confecționată din rășină plastică Escorene (produsă de Exxon Corp.). Ambele aceste rășini plastice reprezintă polietilenă de joasă densitate, dar containerele confecționate din alte materiale plastice, cum ar fi, polipropilenă, polistiren sau alte poliolefine, pot fi, de asemenea, utilizate. Fiolele conținând soluția de deoxiribonuclează au fost stocate, fie, la - 70°C, 2 - 8°C sau 25°C. Inițial, a fost deamidată, aproximativ 60 - 65% din deoxiribonucleaza din soluție.

Soluțiile de deoxiribonuclează din fiole au fost testate la diferite timpuri după stocarea inițială pentru a determina gradul de extindere a deamidării în deoxiribonuclează. Rezultatele acestor încărcări sunt arătate în tabelul III:

Tabelul III

% Deamidare a deoxiribonucleazei umane recombinante depozitată în fiole de plastic și din sticlă

Proba	Ziua	- 70°C	2 - 8°C	25°C
Sticlă	83	66	66	78
	174	63	66	81
Dupont 20	83	65	66	71
	174	63	63	70
Escorane	83	65	66	71
	174	64	62	70

După o stocare, de 83 și 174 de zile, la - 70°C sau 2 - 8°C nu s-a găsit nici o diferență în ceea ce privește cantitatea de deoxiribonuclează deamidată în fiolele din material plastic și cantitatea de deoxiribonuclează deamidată din fiolele de sticlă. În fiecare din aceste cazuri, aproximativ 64% ($\pm 2\%$) din deoxiribonuclează din fiole a fost deoxiribonuclează deamidată.

În mod neașteptat, totuși, după o stocare, de 83 sau 174 de zile, la 25°C, s-a găsit o diferență între cantitatea de deoxiribonuclează deamidată din fiolele de material plastic și cantitatea de deoxiribonuclează deamidată din fiolele de sticlă. În mod semnificativ, o cantitate mai scăzută de deoxiribonuclează deamidată a fost prezentă în fiolele de material plastic. În particular, după o stocare, de 83 de zile, la temperatura, de 25°C, 78% din deoxiribonucleaza din fiolele de sticlă a fost deoxiribonuclează deamidată, în timp ce numai, aproximativ 70% din deoxiribonucleaza din fiolele din material plastic a fost deoxiribonuclează deamidată. După o stocare, de 174 de zile, la temperatura, de 25°C, 81% din deoxiribonucleaza din fiolele de sticlă a fost deoxiribonuclează deamidată, în timp ce numai, aproximativ 71% din deoxiribonucleaza din fiolele de material plastic a fost deoxiribonuclează deamidată.

Fără a limita invenția la un mecanism particular sau la o teorie de operare, s-ar putea ca diferențele în ceea ce privește deamidarea de oxiribonucleazei în fiole din material plastic sau din sticlă, să fie o consecință a diferențelor dintre pH-urile soluțiilor din fiole. Inițial, pH-ul soluției de deoxiribonuclează în fiolele de sticlă a fost

ușor mai ridicat, decât cel din fiolele de material plastic (aproximativ, $pH=6,7$ și, respectiv, aproximativ $pH=6,5$). pH -ul soluției de deoxiribonuclează din fiolele de sticlă a continuat să crească ușor în timp (la pH aproximativ 6,9, după 83 de zile de stocare, la $25^{\circ}C$ și pH aproximativ 7,0, după 174 de zile de stocare, la $25^{\circ}C$), probabil, ca o consecință a silicaților sau ionilor din suprafața sticlei, dizolvați în soluție. La pH mai ridicat viteza de deamidare a deoxiribonucleazei deamidate crește. Întrucât, nu a fost apreciat faptul că, deamidarea deoxiribonucleazei umane apare la pH ridicat, este o realizare a acestei invenții de a formula și/sau de a stoca deoxiribonucleaza umană în soluții, având un pH acid, în mod obișnuit, de aproximativ 4,5 - 6,8, și, cel mai preferabil, la un pH , de aproximativ, 5,0 - 6,8.

Astfel, o îmbunătățire semnificativă în ceea ce privește stabilitatea deoxiribonucleazei umane în soluție este obținută prin introducerea soluției de deoxiribonuclează în fiole din material plastic, decât în fiole de sticlă, cu o deamidare aparent mai mică a deoxiribonucleazei care apare în timp în fiolele de material plastic decât în fiolele de sticlă. Această descoperire poate fi, în mod special, relevantă în alegerea ambalajului deoxiribonucleazei umane pentru uz terapeutic, unde este, în mod special, de dorit ca deoxiribonucleaza umană să fie capabilă a fi stocată pentru perioade îndelungate de timp, fără o pierdere semnificativă a activității enzimatice. Desigur, fiolele de sticlă căptușite cu un material care nu este sticlă, de exemplu, căptușeli din material plastic, ar putea fi la fel de bine utilizate. Ceea ce este important este evitarea stocării deoxiribonucleazei în contact cu sticla, în special, în cazul stocărilor care depășesc 15 - 30 de zile.

În continuare, se va prezenta un test pentru determina activității enzimatice a deoxiribonucleazei umane deamidate și a deoxiribonucleazei umane ne-deamidate.

Au fost utilizate multiple metode pentru a examina efectul deamidării asupra activității enzimatice a deoxiribonucleazei umane. Deoxiribonucleaza umană deamidată purificată și deoxiribonucleaza umană ne-deamidată purificată pentru utilizare în aceste studii a fost preparată cu ajutorul cromatografiei TCX, așa cum a fost descris mai înainte.

În una dintre metodele pentru determinarea activității enzimatice a deoxiribonucleazei, DNA sintetic dublu-catenar, cu 25 perechi de bază în lungime, a fost marcat cu dinitrofenol (DNF) la un capăt și cu biotină la celălalt capăt. Hidroliza substratului de către deoxiribonuclează a fost detectată ca urmare a prinderii produselor de reacție în cavitățile unei plăci microtitru căptușită cu un anticorp, față de DNP și prin determinarea cantității probei intacte cu peroxidază streptavidin - din hrean. Activitatea specifică privind stabilitatea probelor a fost corelată ($r^2 = 0,613$; $n = 5$) cu gradul de deamidare a deoxiribonucleazei (domeniul 27 - 93%). Extrapolarea prin metoda celor mai mici pătrate a asigurat o estimare că, activitatea specifică a deoxiribonucleazei umane deamidate a fost cu, aproximativ, 77% mai scăzută, decât cea a deoxiribonucleazei umane ne-deamidate.

O altă metodă pentru determinare activității enzimatice a deoxiribonucleazei implică hidroliza substratului cromogenic *p*-nitrofenil fenilfosfonat (PNPP), așa cum a fost descris de către Liao și alții, *Biochem.J.*255:781-787 (1988). Cinetica hidrolizei PNPP de către deoxiribonucleaza umană este sigmoidală și a fost rezolvată prin regresie nelineară folosind ecuația Hill. Prin această metodă V_{max} a deoxiribonucleazei umane complet deamidate a fost determinată ca, fiind, cu 77% mai scăzută, decât aceea a deoxiribonucleazei umane ne-deamidate. Concentrația substratului la care se atrage jumătate din activitatea maximă ($S_{0,5}$) nu diferă, în mod semnificativ, pentru probele de deoxiribonuclează deamidată și ne-deamidată umană.

O altă metodă pentru determinarea activității enzimatică a deoxiribonucleazei este testul descris de Kunitz, *J.Physiol.*33: 349 (1950), preferabil, modificat, astfel, încât reacția enzimatică să aibă loc, la un pH, de aproximativ, 7,0 - 7,5. Prin această metodă activitatea enzimatică a deoxiribonucleazei umane deamidate a fost, de asemenea, determinată ca fiind mai scăzută, decât aceea a deoxiribonucleazei umane ne-deamidate.

780

Observații generale

Descrierea de mai înainte detaliază metode specifice care pot fi utilizate pentru a practica prezenta invenție. Posedând metode specifice detaliate utilizate pentru a identifica, a caracteriza, a separa și a utiliza deoxiribonucleaza umană deamidată sau ne-deamidată aici, și în continuare dezvoltarea ca sisteme de model specific, având în legătură cu aceasta, cei care lucrează în domeniu vor cunoaște suficient de bine cum să testeze diferitele metode sigure pentru a ajunge la aceleași informații în utilizarea avantajelor prezentei invenții. Astfel, totuși detalierea celor arătate mai înainte care pot apărea în text, nu trebuie apreciate ca o limitare a scopului global al acesteia.

785

790

LISTA SECVENȚELOR

(1) INFORMAȚII GENERALE

(i) SOLICITANT: Genetech, Inc.

(ii) TITLUL INVENȚIEI: FORME PURIFICATE ALE DEOXIRIBONUCLEAZEI (Dnazei)

795

(iii) NUMĂRUL SECVENȚELOR: 17

(iv) ADRESA CORESPONDENTEI:

(A) ADRESANT: Genentech, Inc.

(B) STRADA: 460 Point San Bruno Blvd.

(C) ORAȘ: South San Francisco

800

(D) STATUL: California

(E) ȚARA: U.S.A.

(F) ZIP: 94080

(v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER

(A) TIPUL MEDIULUI: 5,25 inch, 360 Kb floppy disc.

805

(B) COMPUTER: IBM PC compatibil

(C) SISTEM DE OPERARE: PC - DOS/MS - DOS

(D) SOFTWARE: patin (Genentech)

(vi) DATA CURENTĂ A CERERII

(A) NUMĂRUL CERERII:

810

(B) DATA ÎNREGISTRĂRII

(C) CLASIFICAREA

(vii) DATA CERERII ANTERIOARE

(A) NUMĂRUL CERERII:

(B) DATA ÎNREGISTRĂRII:

815

(viii) ÎMPUTERNICIT/AGENT DE INFORMARE

(A) NUME: Johnston, Sean A.

(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 35910

(C) NUMĂR DE REFERINȚĂ/EVIDENȚĂ: 747

(ix) INFORMAȚII DE TELECOMUNICAȚIE:

820

(A) TELEFON: 415/225 - 35622

(B) TELEFAX: 415/952 - 9881

(C) TELEX: 910/371 - 7168

(2) INFORMAȚII PENTRU SECV.ID Nr. 1:

(I) CARACTERISTICILE SECVENȚEI:

825

(A) LUNGIMEA: 346 aminoacizi

RO 117188 B1

(B) TIPUL: amino acid

(C) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV.ID Nr.1:

830	Ser Cys Thr Gly Ser Ala Leu Lys Cys Phe Phe Arg Asp Leu Ser	1 5 10 15
	Ser Xaa Thr Thr Phe Phe Ser Leu Ser Ser Lys Arg Arg Lys Leu	20 25 30
	Ser Ser Lys Asp Ile Pro Asp Ser Xaa Gln His Ser Arg His Leu	35 40 45
835	Xaa Gly His His His His Leu Arg Met Arg Gly Met Lys Leu Leu	50 55 60
	Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly Ala Val Ser	65 70 75
	Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys	80 85 90
840	Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser	95 100 105
	Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu	110 115 120
845	Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro	125 130 135
	Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser	140 145 150
	Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser	155 160 165
850	Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly	170 175 180
	Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser	185 190 195
	Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala	200 205 210
855	Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val	215 220 225
	Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu	230 235 240
	Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln	245 250 255
860	Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu	260 265 270
	Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala	275 280 285
865	Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val	290 295 300
	Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly	305 310 315
	Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val	320 325 330
870	Glu Val Met Leu Lys Xaa Ala Ala Pro Pro His Thr Ser Xaa Thr	335 340 345
	Ala	346

RO 117188 B1

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.2

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 1039 baze

875

(B) TIP: acid nucleic

(C) RĂSUCIRE: singură

(D) TOPOLOGIE: lineară

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.2:

TCCTGCACAG GCAGTGCCTT GAAGTGCTTC TTCAGAGACC TTTCTTCATA 50

880

GACTACTTTT TTTTCTTTAA GCAGCAAAAG GAGAAAATTG TCATCAAAGG 100

ATATTCCAGA TTCTTGACAG CATTCTCGTC ATCTCTGAGG ACATCACCAT 150

CATCTCAGGA TGAGGGGCAT GAAGCTGCTG GGGGCGCTGC TGGCACTGGC 200

885

GGCCCTACTG CAGGGGGCCG TGTCCCTGAA GATCGCAGCC TTCAACATCC 250

AGACATTTGG GGAGACCAAG ATGTCCAATG CCACCCTCGT CAGCTACATT 300

890

GTGCAGATCC TGAGCCGCTA TGACATCGCC CTGGTCCAGG AGGTCAGAGA 350

CAGCCACCTG ACTGCCGTGG GGAAGCTGCT GGACAACCTC AATCAGGATG 400

CACCAGACAC CTATCACTAC GTGGTCAGTG AGCCACTGGG ACGGAACAGC 450

895

TATAAGGAGC GCTACCTGTT CGTGTACAGG CCTGACCAGG TGTCTGCGGT 500

GGACAGCTAC TACTACGATG ATGGCTGCGA GCCCTGCGGG AACGACACCT 550

900

TCAACCGAGA GCCAGCCATT GTCAGGTTCT TCTCCCGGTT CACAGAGGTC 600

AGGGAGTTTG CCATTGTTCC CCTGCATGCG GCCCCGGGGG ACGCAGTAGC 650

CGAGATCGAC GCTCTCTATG ACGTCTACCT GGATGTCCAA GAGAAATGGG 700

905

GCTTGAGGA CGTCATGTTG ATGGGCGACT TCAATGCGGG CTGCAGCTAT 750

GTGAGACCCT CCCAGTGGTC ATCCATCCGC CTGTGGACAA GCCCCACCTT 800

910

CCAGTGGCTG ATCCCCGACA GCGCTGACAC CACAGCTACA CCCACGCACT 850

GTGCCTATGA CAGGATCGTG GTTGACAGGA TGCTGCTCCG AGGCGCCGTT 900

GTTCCCGACT CGGCTCTTCC CTTTAACTTC CAGGCTGCCT ATGGCCTGAG 950

915

TGACCAACTG GCCCAAGCCA TCAGTGACCA CTATCCAGTG GAGGTGATGC 1000

TGAAGTGAGC AGCCCCCTCCC CACACCAGTT GAACTGCAG 1039

- 920 (2) INFORMAȚIA PENTRU SECV. ID NR.3
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
 (A) LUNGIME: 13 aminoacizi
 (B) TIP: aminoacid
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.3:

925 Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys
 1 5 10 13

- 930 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.4:
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
 (A) LUNGIME: 16 aminoacizi
 (B) TIP: aminoacid
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.4:

935 Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg
 1 5 10 15 16

- 940 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.5:
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
 (A) LUNGIME: 10 aminoacizi
 (B) TIP: aminoacid
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.5:

945 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 5

Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg
 1 5 10

- 950 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.6:
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
 (A) LUNGIME: 9 aminoacizi
 (B) TIP: aminoacid
 (D) TOPOLOGIE: linear
 955 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.6:

Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys
 1 5 9

- 960 (2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.7:
 (i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
 (A) LUNGIME: 23 aminoacizi
 (B) TIP: aminoacid
 (D) TOPOLOGIE: linear

RO 117188 B1

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.7:

Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu
1 5 10 15 20
Gly Arg
23

965

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.8:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 4 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

970

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.8:

Asn Ser Tyr Lys
1 4

975

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.9:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 32 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

980

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.9:

Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly
1 5 10 15 20
Cys Glu Pro Cys Gly Asn Asp Thr Phe Asn Arg
25 30

985

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.10:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 6 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

990

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.10:

Glu Pro Ala Ile Val Arg
1 5

1000

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.11:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 4 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

1005

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.11:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

1010

Phe Phe Ser Arg
1 4

RO 117188 B1

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.12:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

1015

(A) LUNGIME: 5 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.12:

1020

Phe Thr Glu Val Arg

1

5

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.13:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

1025

(A) LUNGIME: 31 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.13:

1030

Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr

1

5

10

15

20

Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys

25

30

1035

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.14:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 28 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

1040

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.14:

Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg

1

5

10

15

20

Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg

1045

25

28

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.15:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 28 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

1050

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.15:

Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro

1055

1

5

10

15

20

Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg

25

28

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR. 16:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 9 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.16:

Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg

1

5

9

1060

1065

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV. ID NR.17:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 38 aminoacizi

(B) TIP: aminoacid

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID nr.17:

Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp

1

5

10

15

20

Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys

25

30

35

38

1070

1075

Revendicări

1. DNază umană purificată având secvența de aminoacizi, prezentată în fig. 1, **caracterizată prin aceea că** restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă este deamidat sau ne-deamidat, precum și variante ale acestora rezultate în urma mutațiilor punctiforme (adiție, deleție, inserție), având activitate de hidrolizare DNA enzimatică.

1080

2. DNază umană purificată, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă este ne-deamidat și este, în mod substanțial, liberă de DNaza deamidată la acest reziduu.

1085

3. Procedeu pentru prepararea DNazei umane purificate deamidate la restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă sau a DNazei umane purificate ne-deamidate la restul Asn corespunzător Asn 74 din DNaza umană nativă dintr-un amestec al acestora, **caracterizat prin aceea că** amestecul menționat se separă cu o rășină schimbătoare de cationi tentaculară sau cu o rășină heparin imobilizată sau cu o rășină DNA analogă, nehidrolizabilă, imobilizată.

1090

4. Compoziție de DNază umană purificată, definită în revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că**, DNaza umană deamidată este prezentă într-o cantitate mai mică, de aproximativ 25%, în greutate, din DNaza totală în compoziție.

1095

5. Compoziție, conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că**, DNaza umană deamidată este prezentă într-o cantitate mai mică, de aproximativ 5%, în greutate, din DNaza totală în compoziție.

1100

6. Compoziție, conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că**, DNaza umană deamidată este prezentă într-o cantitate mai mică, de aproximativ 1%, în greutate, din DNaza totală în compoziție.

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **biochim. Eremia Laura**

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;

```

1 TCCTGCACAG GCAGTGCCTT GAAGTGCTTC TTCAGAGACC TTTCTTCATA
  AGGACGTGTC CGTCACGGAA CTTACGAAG AAGTCTCTGG AAAGAAGTAT
1 SerCysThrG lySerAlaLe uLysCysPhe PheArgAspL euSerSerAM

101 ATATTCCAGA TTCTTGACAG CATTCTCGTC ATCTCTGAGG ACATCACCAT
   TATAAGGTCT AAGAACTGTC GTAAGAGCAG TAGAGACTCC TGTAGTGGTA
 35   IleProAs pSerOP*Gln HisSerArgH isLeuOP*Gl yHisHisHis

201 GGCCCTACTG CAGGGGGCCG TGTCCTCTGAA GATCGCAGCC TTCAACATCC
   CCGGGATGAC GTCCCCCGGC ACAGGGGACTT CTAGCGTCGG AAGTTGTAGG
 68   AlaLeuLeu GlnGlyAlaV alSerLeuLy sIleAlaAla PheAsnIleG

301 GTGCAGATCC TGAGCCGCTA TGACATCGCC CTGGTCCAGG AGGTCAGAGA
   CACGTCTAGG ACTCGGCGAT ACTGTAGCGG GACCAGGTCC TCCAGTCTCT
101 ValGlnIleL euSerArgTy rAspIleAla LeuValGlnG luValArgAs

401 CACCAGACAC CTATCACTAC GTGGTCAGTG AGCCACTGGG ACGGAACAGC
   GTGGTCTGTG GATAGTGATG CACCAGTCAC TCGGTGACCC TGCCTTGTCTG
135   ProAspTh rTyrHisTyr ValValSerG luProLeuGl yArgAsnSer

501 GGACAGCTAC TACTACGATG ATGGCTGCGA GCCCTGCGGG AACGACACCT
   CCTGTCTGATG ATGATGCTAC TACCGACGCT CGGGACGCCC TTGCTGTGGA
168   AspSerTyr TyrTyrAspA spGlyCysGl uProCysGly AsnAspThrP

601 AGGGAGTTTG CCATTGTTCC CCTGCATGCG GCCCCGGGGG ACCGAGTAGC
   TCCCTCAAAC GGTAACAAGG GGACGTACGC CGGGGCCCCC TGGCTCATCG
201 ArgGluPheA laIleValPr oLeuHisAla AlaProGlyA spArgValAl

701 GCTTGAGGGA CGTCATGTTG ATGGGCGACT TCAATGCGGG CTGCAGCTAT
   CGAACCTCCT GCAGTACAAC TACCCGCTGA AGTTACGCCC GACGTGCGATA
235   LeuGluAs pValMetLeu MetGlyAspP heAsnAlaGl yCysSerTyr

801 CCAGTGGCTG ATCCCCGACA GCGCTGACAC CACAGCTACA CCCACGCACT
   GGTCAACGAC TAGGGGCTGT CGCGACTGTG GTGTCTGATG GGGTGCGTGA
268   GlnTrpLeu IleProAspS erAlaAspTh rThrAlaThr ProThrHisC

901 GTTCCCGACT CGGCTCTTCC CTTTAACTTC CAGGCTGCCT ATGGCCTGAG
   CAAGGGCTGA GCCGAGAAGG GAAATTGAAG GTCCGACGGA TACCGGACTC
301 ValProAspS erAlaLeuPr oPheAsnPhe GlnAlaAlaT yrGlyLeuSe

1001 TGAAGTGTAGC AGCCCTCCCC CACACCAGTT GAACTGCAG
   ACTTCACTCG TCGGGGAGGG GTGTGGTCAA CTTGACGTC
335   LysOP*Al aAlaProPro HisThrSerO P*ThrAla

```

Fig. 1A

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;

GACTACTTTT TTTTCTTTAA GCAGCAAAAG GAGAAAATTG TCATCAAAGG
CTGATGAAAA AAAAGAAATT CGTCGTTTTTC CTCTTTTAAC AGTAGTTTCC
*ThrThrPhe PheSerLeuS erSerLysAr gArgLysLeu SerSerLysAsp

CATCTCAGGA TGAGGGGCAT GAAGCTGCTG GGGGCGCTGC TGGCACTGGC
GTAGAGTCCT ACTCCCCGTA CTTTCGACGAC CCCC GCGACG ACCGTGACCG
HisLeuArgM etArgGlyMe tLysLeuLeu GlyAlaLeuL euAlaLeuAla

AGACATTTGG GGAGACCAAG ATGTCCAATG CCACCCTCGT CAGCTACATT
TCTGTAAACC CCTCTGGTTC TACAGGTTAC GGTGGGAGCA GTCGATGTAA
lnThrPheGl yGluThrLys MetSerAsnA laThrLeuVa lSerTyrIle

CAGCCACCTG ACTGCCGTGG GGAAGCTGCT GGACAACCTC AATCAGGATG
GTCGGTGGAC TGACGGCACC CCTTCGACGA CCTGTTGGAG TTAGTCCTAC
pSerHisLeu ThrAlaValG lyLysLeuLe uAspAsnLeu AsnGlnAspAla

TATAAGGAGC GCTACCTGTT CGTGTCAGG CCTGACCAGG TGTCTGCGGT
ATATTCCTCG CGATGGACAA GCACATGTCC GGACTGGTCC ACAGACGCCA
TyrLysGluA rgTyrLeuPh eValTyrArg ProAspGlnV alSerAlaVal

TCAACCGAGA GCCAGCCATT GTCAGGTTCT TCTCCCGGTT CACAGAGGTC
AGTTGGCTCT CGGTCGGTAA CAGTCCAAGA AGAGGGCCAA GTGTCTCCAG
heAsnArgGl uProAlaIle ValArgPheP heSerArgPh eThrGluVal

CGAGATCGAC GCTCTCTATG ACGTCTACCT GGATGTCCAA GAGAAATGGG
GCTCTAGCTG CGAGAGATAC TGCAGATGGA CCTACAGGTT CTCTTTACCC
aGluIleAsp AlaLeuTyrA spValTyrLe uAspValGln GluLysTrpGly

GTGAGACCCT CCCAGTGGTC ATCCATCCGC CTGTGGACAA GCCCCACCTT
CACTCTGGGA GGGTCACCAG TAGGTAGGCG GACACCTGTT CGGGGTGGAA
ValArgProS erGlnTrpSe rSerIleArg LeuTrpThrS erProThrPhe

GTGCCTATGA CAGGATCGTG GTTGCAAGGA TGCTGCTCCG AGGCGCCGTT
CACGGATACT GTCCTAGCAC CAACGTCCCT ACGACGAGGC TCCGCGGCAA
ysAlaTyrAs pArgIleVal ValAlaGlyM etLeuLeuAr gGlyAlaVal

TGACCAACTG GCCCAAGCCA TCAGTGACCA CTATCCAGTG GAGGTGATGC
ACTGGTTGAC CGGGTTCGGT AGTCACTGGT GATAGGTCAC CTCCACTACG
rAspGlnLeu AlaGlnAlaI leSerAspHi sTyrProVal GluValMetLeu

Fig. 1B

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;

C 07 K 1/00;

A 61 K 38/46;

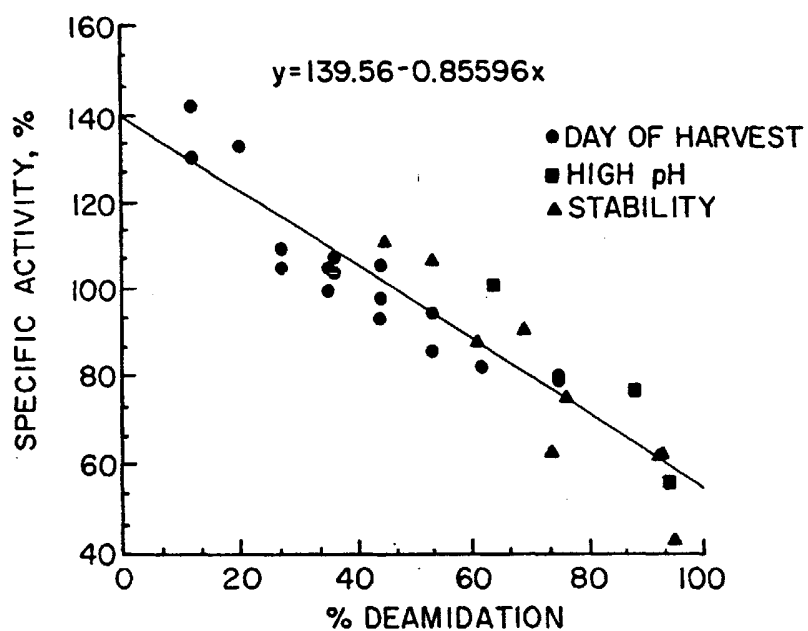
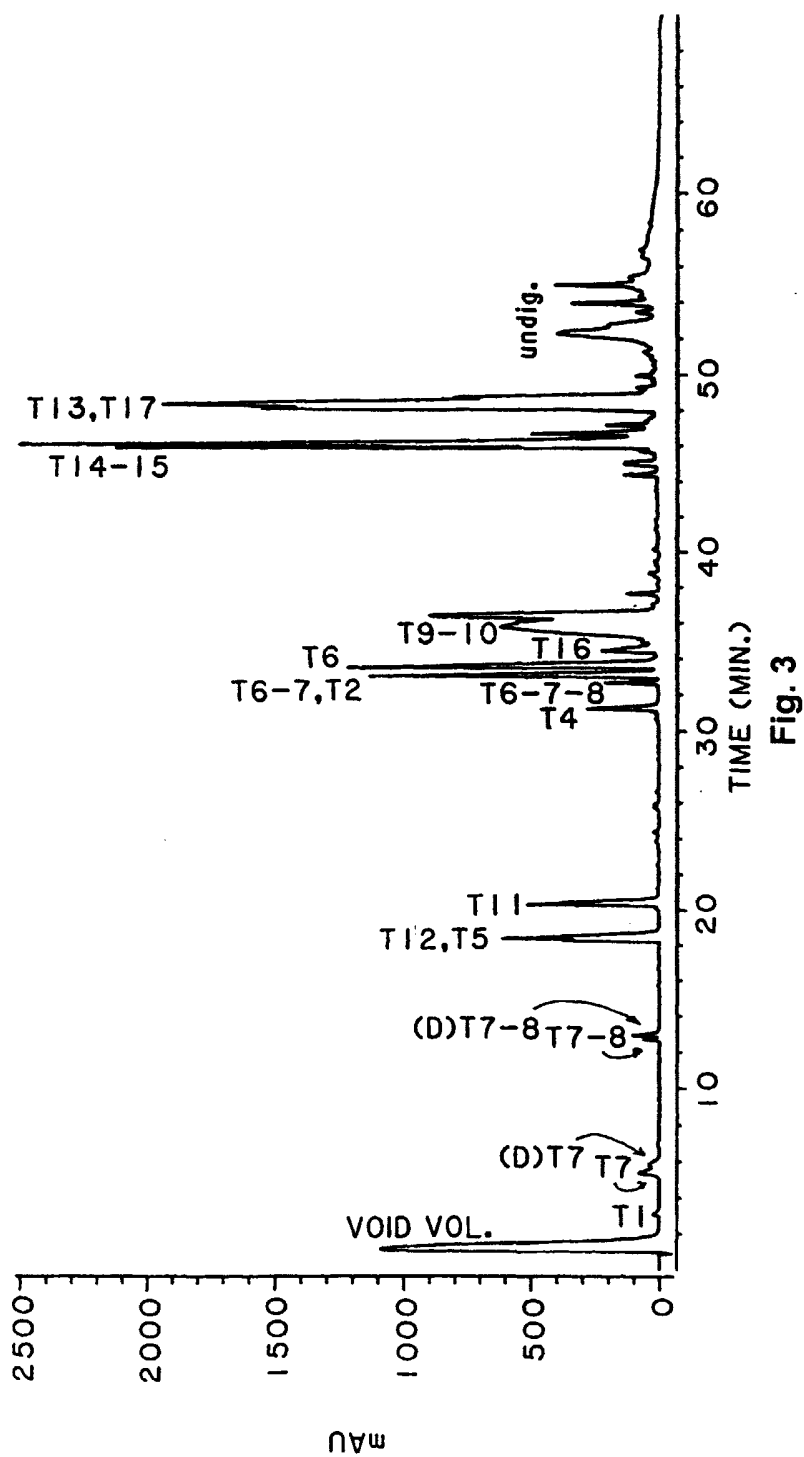


Fig. 2





(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;

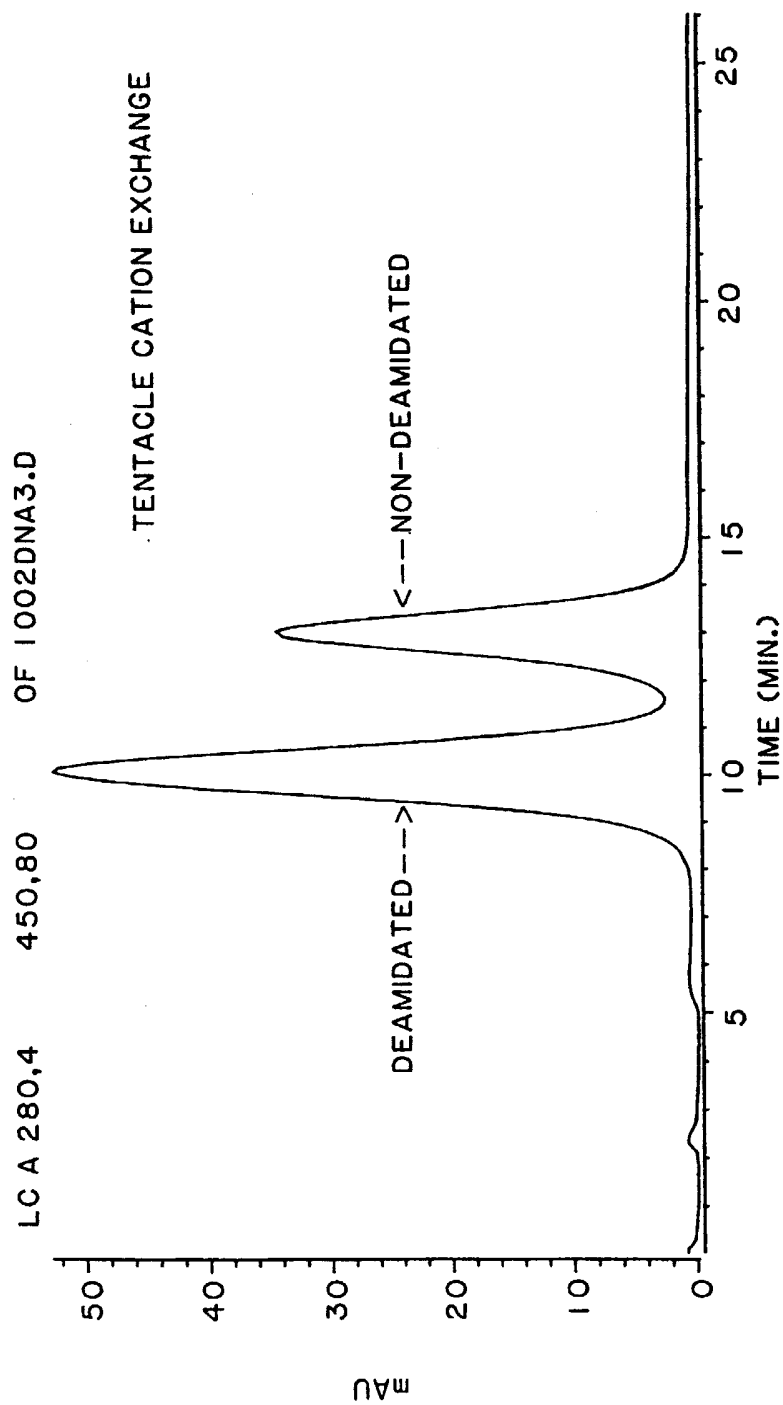


Fig. 5

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;

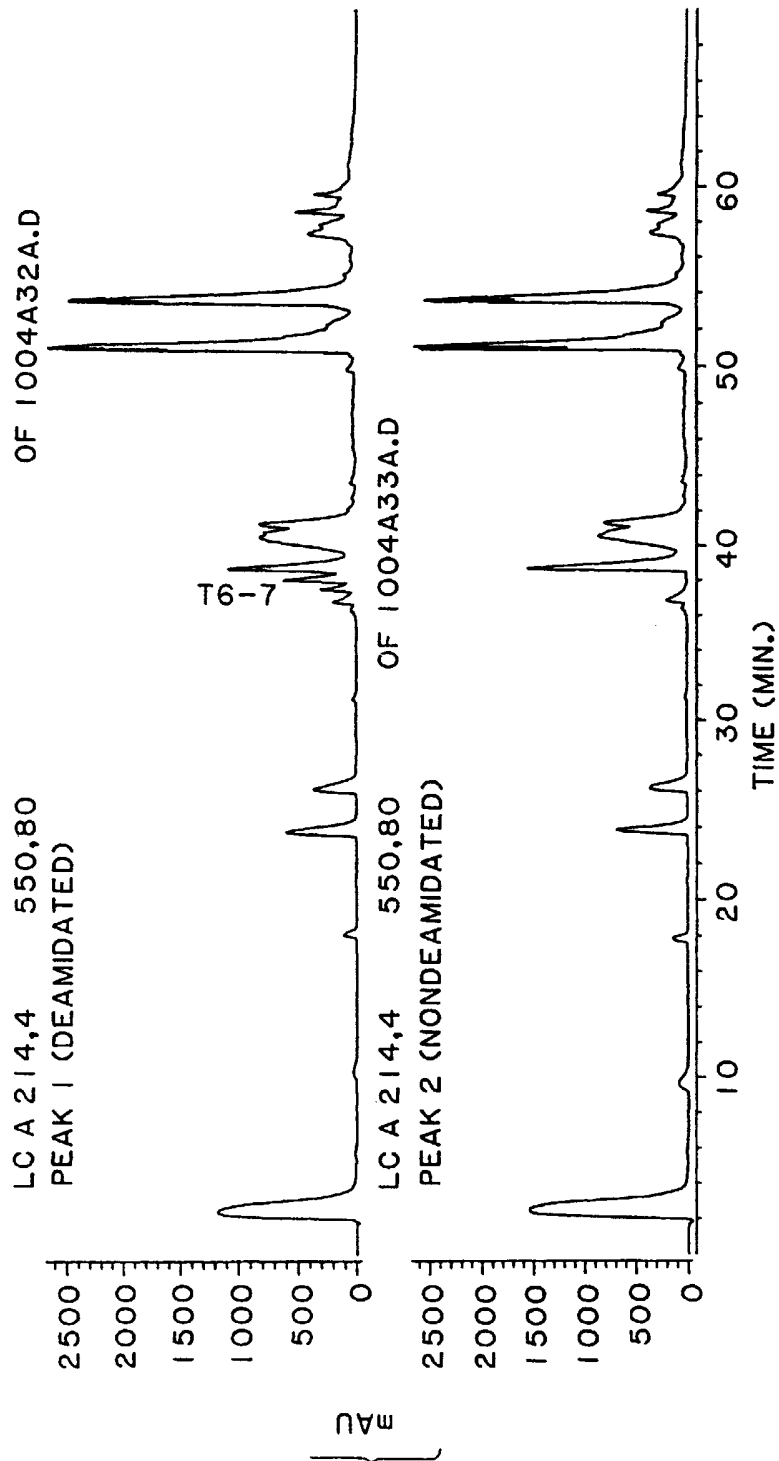


Fig. 6

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;

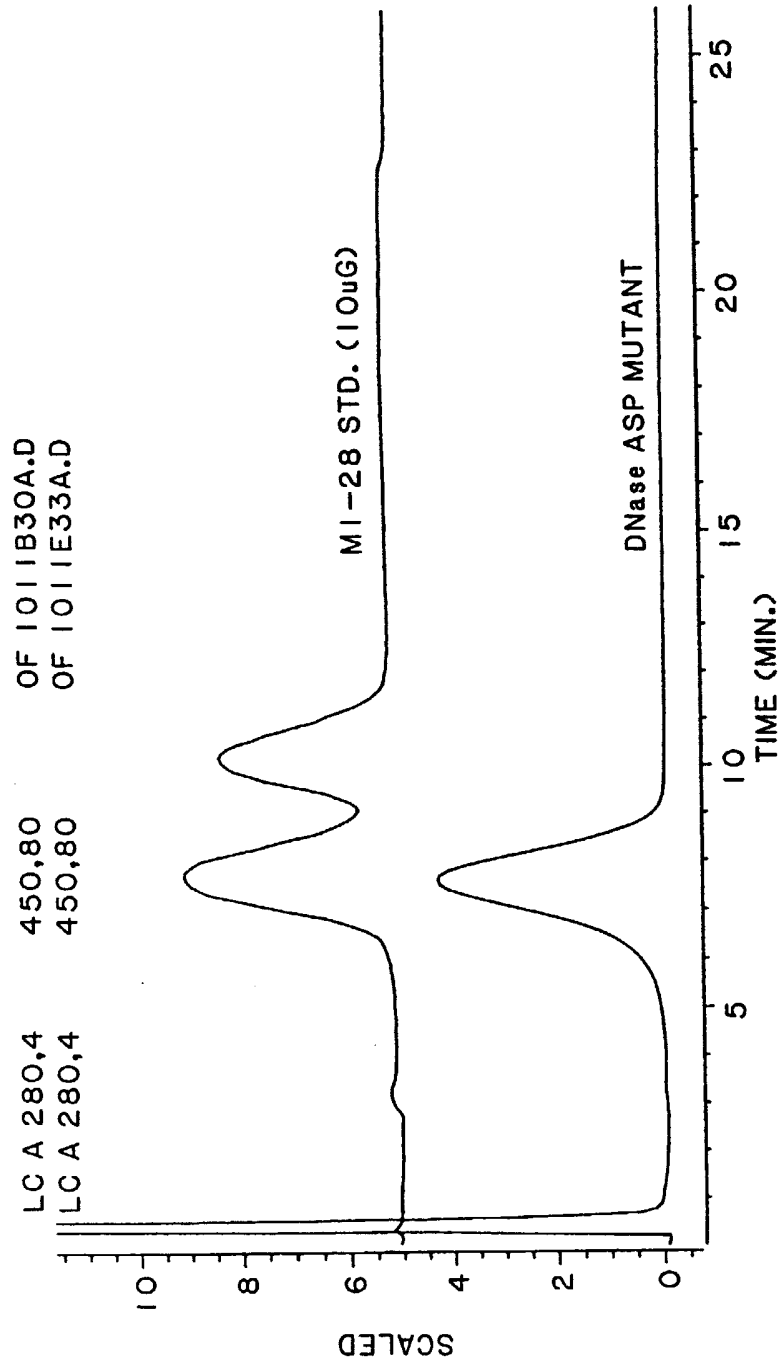
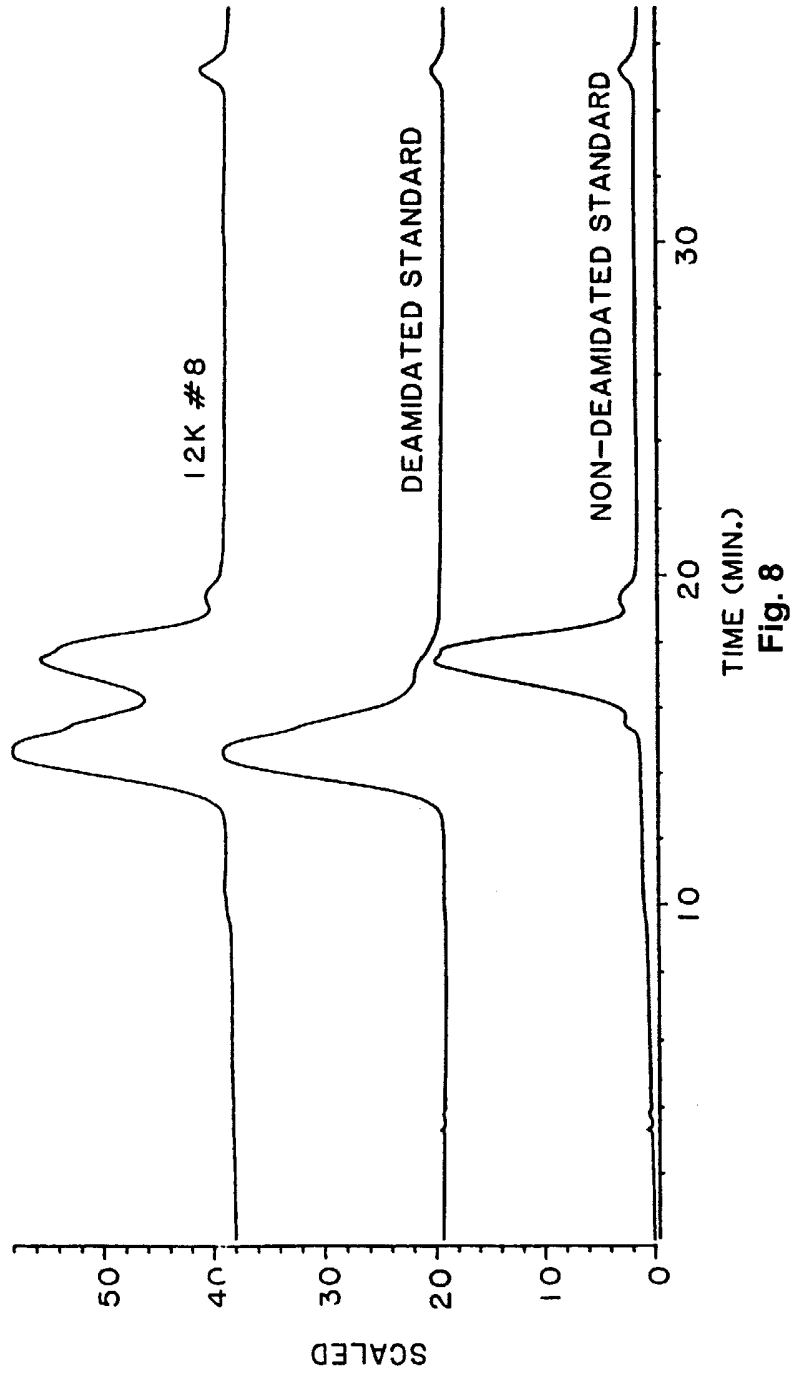


Fig. 7

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;



(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 9/22;
C 07 K 1/00;
A 61 K 38/46;

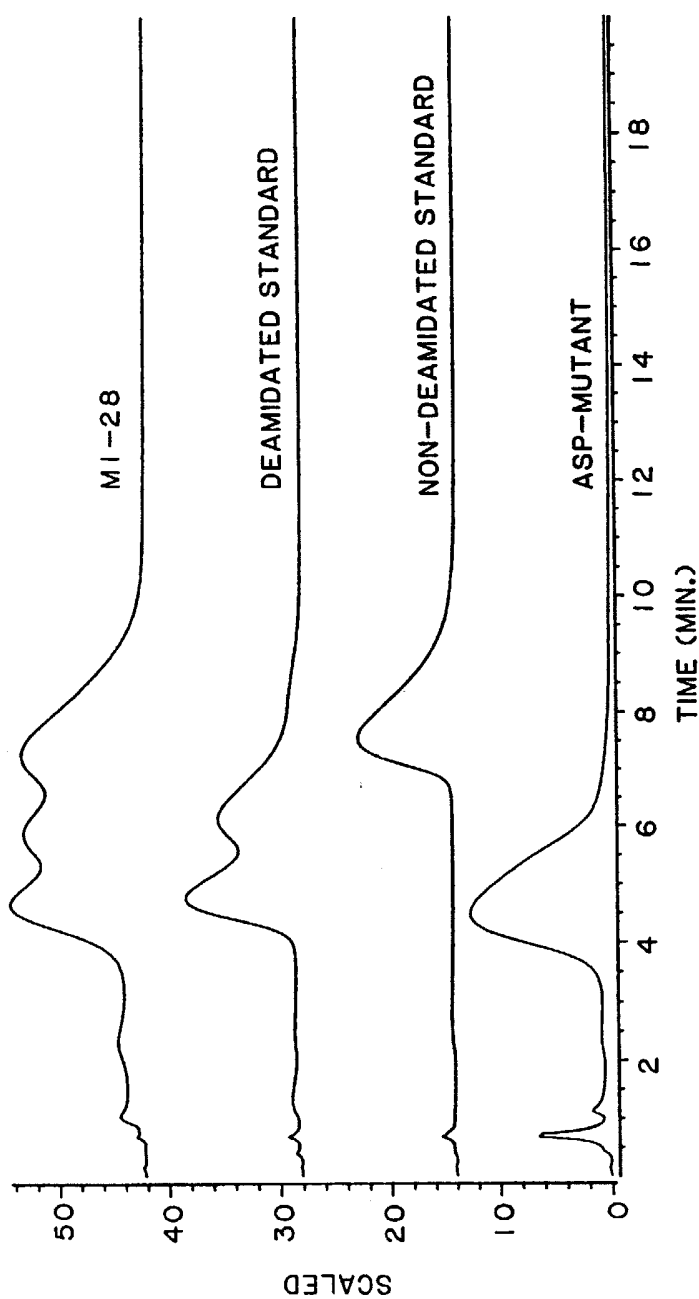


Fig. 9

