

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3943-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.06.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/482271**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 09. 98**
(Věstník č. 9/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/08113**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/40736**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K	1/14
C 07 K	14/435
C 07 K	14/65
C 12 N	15/12

(71) Přihlášovatel:

CELTRIX PHARMACEUTICALS, INC., Santa Clara, CA, US;

(72) Původce:

Sommer Andreas, Danville, CA, US;

Ogawa Yasushi, Pacifica, CA, US;

Tao Peggy, San Jose, CA, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob produkce IGF-1 a IGFBP-3
s řádným svinutím a disulfidovou vazbou**

(57) Anotace:

Nový způsob pro znovusvinutí inzulinu podobného růstového faktoru 1 /IGF-1/ a vazebného proteinu 3 pro inzulinu podobný růstový faktor 1 /IGFBP-3/. Způsob obsahuje smísení IGF-1 a IGFBP-3 dohromady v reakci, společného skládání. Vynalezený způsob společného svinutí vede k podstatně vyššímu výnosu řádně složeného proteinu pro obě molekuly a mění kinetiku znovusvinutí. Metoda zahrnuje produkci řádně svinutých IGF-1, IGFBP-3 a/nebo komplexu IGF-1/IGFBP-3.

CZ 3943-97 A3

stimulace
Způsob produkce IGF-1 a IGFBP-3 s řádným ~~složením~~ a
disulfidovou vazbou

Oblast techniky

Vynález se obecně týká oblasti produkce aktivních, řádně složených proteinů a zejména se týká složení polypeptidů inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1) a vazebného proteinu-3 pro inzulinu podobný růstový faktor (IGFBP-3).

Dosavadní stav techniky

Růstové faktory jsou polypeptidy, které stimulují velkou šíři biologických odpovědí (např syntézu DNA, buněčné dělení, expresi specifických genů, atd.) v definované populaci cílových buněk. Bylo identifikováno mnoho růstových faktorů, včetně transformujícího růstového faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$, TGF- $\beta 4$, TGF- $\beta 5$, epidermálního růstového faktoru (EGF), od destiček odvozeného růstového faktoru (PDGF), fibroblastového růstového faktoru (FGF), inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1) a IGF-2.

IGF-1 a IGF-2 jsou příbuzné v aminokyselinové sekvenci a struktuře, kde každý polypeptid má molekulovou hmotnost asi 7,5 kilodaltonů (kDa). IGF-1 zprostředkuje hlavní účinky růstového hormonu a tak je to primární mediátor růstu po narození. IGF-1 se také účastní účinku různých jiných růstových faktorů, protože ošetření buněk takovými faktory vede ke zvýšené produkci IGF-1. Oproti tomu, o IGF-2 se soudí, že má hlavní roli ve fetálním růstu. Jak IGF-1, tak IGF-2 mají inzulinu podobné aktivity (odtud jejich jména), a

jsou mitogenní (stimulují buněčné dělení) pro buňky v nervové tkáni, svalech, reprodukční tkáni, skeletální tkáni a mnoha jiných tkání.

Oproti většině růstových faktorů jsou IGF přítomny ve významném množství v cirkulaci, ale pouze velmi malá frakce tohoto IGF je volná v cirkulaci nebo v jiných tělesných tekutinách. Většina cirkulujícího IGF je navázána na IGF vazebný protein - 3 (IGFBP-3). IGF-1 může být měřen v séru pro diagnostiku abnormálních růstových stavů, např. pituitárního gigantismu, akromegalie, trpasličtství nebo různých deficiencí růstového hormonu. Ačkoliv je IGF-1 produkován v mnoha tkáních, soudí se, že většina cirkulujícího IGF-1 je syntetizována v játrech.

Téměř všechny IGF cirkuluje v nekovalentně asociovaném trojitém komplexu složeném z IGF-1 nebo IGF-2, IGFBP-3 a větší proteinové podjednotky nazývané podjednotka labilní vůči kyselinám (ALS). Tento trojitý komplex je složen z ekvimolárních množství každé ze tří složek. ALS nemá žádnou přímou IGF-vazebnou aktivitu a zdá se, že váže pouze binární komplex IGF/IGFBP-3. Trojitý komplex IGF+IGFBP-3+ALS má molekulovou hmotnost asi 150 kDa. O tomto trojitém komplexu se soudí, že v cirkulaci účinkuje jako "rezervoár a pufr pro IGF-1 a IGF-2, který brání rychlým změnám v koncentraci volného IGF" (Blum et al., (1991), "Plasma IGFBP-3 Levels as Clinical Indicators" v Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors, str. 381 - 393, (E.M. Spencer, vyd., Elsevier, New York).

Většina cirkulujícího IGF-1, IGF-2 a IGFBP-3 je ve formě

komplexu a v souladu s tím je velmi malé množství volného IGF detegovatelné. Kromě toho, vysoká hladina volného IGF v krvi je nežádoucí. Vysoké hladiny volného IGF v krvi vedou k závažné hypoglykemii vzhledem k inzulinu podobným aktivitám IGF. Oproti IGF a IGFBP-3 existuje významný pool volného ALS v plasmě, což zajišťuje to, že jakýkoliv IGF/IGFBP-3 komplex, který vstoupí do cirkulace, tvoří ihned trojitý komplex.

Zatímco IGFBP-3 je nejhojnější vazebný protein pro IGF v cirkulaci, v různých tkáních a tělesných tekutinách bylo identifikováno alespoň pět jiných vazebných proteinů pro IGF (IGFBP). Ačkoliv tyto proteiny váží IGF, každý z nich pochází z různých genů a má různou aminokyselinovou sekvenci. Tak tyto vazebné proteiny nejsou pouze analoga a deriváty společného prekurzoru. Oproti IGFBP-3 nejsou ostatní cirkulující IGFBP saturovány IGF. Kromě IGFBP-3 nemůže žádný z IGFBP tvořit trojitý komplex o molekulové hmotnosti 150 kDa.

IGF-1 a IGFBP-3 mohou být purifikovány z přirozených zdrojů nebo mohou být produkovány rekombinantními prostředky. Například, purifikace IGF-1 z lidského séra je v oboru dobře známá (Rinderknecht et al., (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2365 - 2369). Produkce IGF-1 rekombinantními procesy je ukázána v EP 0.128.733, publikovaném v prosinci 1984. IGFBP-3 může být purifikován z přirozených zdrojů za použití procesu jako je ten, který je ukázán v Baxter et al., (1986), "Growth Hormone-Dependent Inzulin-Like Growth Factors (IGF) Binding Protein from Human Plasma Differs from Other IGF Binding Proteins", Biochem.

Biophys. Res. Comm. 139: 1256 - 1261). IGFBP-3 může být syntetizován rekombinantními organismy jak popisuje Sommer et al., (výše, str. 715 - 728). Rekombinantní IGFBP-3 se váže na IGF-1 v molárním poměru 1:1.

Topické podání IGF-1/IGFBP-3 komplexu do ran krys a prasat je signifikantně více účinné než podání IGF-1 samotného (Sommer et al., výše). Podkožní podání komplexu IGF-1/IGFBP-3 hypofyzektomovaným, ovarektomovaným a normálním krysám, stejně jako intravenozní podání "cynomolgous" opicím, v podstatě zabraňuje hypoglykemickým účinkům IGF-1 podaného samostatně.

Jak IGF-1, tak IGFBP-3 mají disulfidovou isomerasovou aktivitu, když jsou měřeny samostatně. Nicméně, smísení těchto dvou proteinů v podstatě inhibuje tuto aktivitu (Koedam and Leo van den Brande (1994) "Inzuline-Like Growth Factors (IGFs) and IGF Binding Protein-3 Display Disulfide Isomerase Activity" Biochem. Biophys. Res. Comm. 198: 1225 - 1231).

Genetické inženýrství také umožnilo produkovat velká množství polypeptidů kodovaných klonovanou DNA prostřednictvím rekombinantních expresních systémů, zejména prostřednictvím exprese v prokaryontech jako je Escherichia coli. Exprimovaný heterologní polypeptid, který by jinak nebyl vůbec produkován hostitelskými buňkami nebo by byl produkován pouze v omezeném množství, může vytvářet významnou část celkových buněčných polypeptidů hostitelské buňky.

Vážné problémy se často vyskytují, pokud jsou klonované DNA exprivovány ve vysokých úrovních v rekombinantních expresních systémech. Polypeptidy, které jsou nadměrně exprivovány v cytoplasmě hostitelské buňky jsou často akumulovány jako nerozpustná "inkluzní tělíska" nebo "refraktilní tělíska", zejména pokud jsou jako hostitelské buňky použity bakterie (Williams et al., (1982), Science 215: 687 - 689; Schoner et al., (1985), Biotechnology 3: 151 - 154). Nicméně, tvorba inkluzí není omezena na bakteriální expresní systémy. Například, produkt Kruppel genu u Drosophilli může tvořit inkluzní tělíska, když je produkován ve hmyzích buňkách za použití bakulovirového expresního systému. Polypeptidy akumulované ve formě inkluzních tělísek nebo refraktilních tělísek jsou relativně nepoužitelné pro biologické a biochemické testy. Konverze tohoto nerozpustného materiálu na aktivní, rozpustné polypeptidy vyžaduje pomalou a obtížnou solubilizaci a protokol znovu skládání, což zvyšuje náklady na produkci polypeptidu a často to znatelně redukuje výtěžek aktivního polypeptidu.

I když jsou heterologní polypeptidy exprivovány v cytoplasmě hostitelských buněk v rozpustné formě, nemusí být biologicky aktivní díky nesprávné skladbě. Nesprávné složení může proběhnout v cytoplasmě hostitelské buňky nebo během postupu izolace.

Obtíže, které jsou součástí získání biologicky aktivních rekombinantních proteinů a rekombinantních expresních systémů jsou zvýšeny u polypeptidů obsahujících cysteinové zbytky, jako je IGF-1. IGF-1 obsahuje šest cysteinových zbytků, každý z nich tvoří intramolekulární disulfidovou

vazbu o které se soudí, že stabilizuje aktivní konformaci proteinu. Cysteinové zbytky v IGF-1 mohou tvořit nesprávné disulfidové vazby, t.j. disulfidové vazby tvořené mezi cysteinovými zbytky, které nejsou nacházeny v nativním IGF-1. Molekuly IGF-1 obsahující nesprávné disulfidové vazby mají redukovanou biologickou aktivitu (Raschdorf et al., (1988) (Biomed. Env. Mass Spectros. 16: 3 - 8).

Bylo zjištěno, že množství rozpustného polypeptidu může být zvýšeno v E. coli rekombinantní expresi, pokud je fermentační teplota snížena pod 30 °C. Tento postup je použitelný jako alternativa k renaturaci polypeptidů z inkluzních tělísek, ale vyžaduje expresní systém, který účinně operuje pod 30 °C. Tento postup nicméně nemusí být komerčně vyhovující, protože redukce fermentační teploty zvyšuje trvání, a proto i nákladnost, fermentace s průvodním zvýšením rizika kontaminace kultury.

V oboru je známo mnoho metod pro znovusložení proteinů. Například U.S: patenty č. 4511502, 4511503 a 4512922 popisují metody, které jsou považovány za univerzálně aplikovatelné, s pouze drobnými modifikacemi, pro znovusložení proteinů získaných z inkluzních tělísek. Tyto metody se obecně snaží o narušení struktury nesprávně složených proteinů, potom o umožnění slabých intramolekulárních sil, t.j. vodíkových můstků, hydrofobních interakcí a iontových vazeb, pro složení proteinu do jeho správné konformace a potom následuje oxidace za vytvoření řádných disulfidových vazeb.

V jedné takové metodě je protein, který má být znovu

složen, purifikován za podmínek, které uchovávají cysteinové skupiny proteinu jako volné sulfhydrylové skupiny inkluzí redukčního činidla během procesu purifikace. Toto umožňuje znovusložení proteinu během procesu purifikace za absence nesprávných intramolekulárních disulfidových vazeb. Redukční činidlo je potom ředěno pro umožnění toho, aby znovusložený protein tvořil disulfidové můstky za přítomnosti vzduchu nebo nějakého jiného oxidačního činidla. Tato metoda může být snadno inkorporována do většiny purifikačních procesů a optimálně funguje pro rekombinantní proteiny mající relativně nekomplikované terciární struktury.

Jiným přístupem je znovusložení proteinu za přítomnosti jak redukované (R-SH), tak oxidované (R-S-S-R) formy thiolové sloučeniny. Toto umožňuje tvorbu, porušení a znovu tvorbu disulfidových vazeb během procesu purifikace. Redukované a oxidované formy thiolové sloučeniny jsou poskytnuty v pufru majícím dostatečnou denaturující sílu pro to, aby všechny meziproductové formy proteinu zůstávaly solubilní během, procesu solubilizace. Močovina se považuje za vhodný denaturant vzhledem ke své denaturační síle pro meziproducty, která umožňuje proteinu dosáhnout jeho správné konformace a také udržuje rozpustnost meziproductů skládání. Tento přístup je nejúčinnější, pokud má protein, který má být složen, relativně nekomplikovaný charakter skladby.

Alternativním přístupem, který může být použit pro složitější situace skladby, je rozrušení jakýchkoliv disulfidových vazeb, které mohou být tvořeny během syntézy nebo izolace proteinu, potom derivatizování volných thiolových skupin proteinu. Volné thiolové skupiny jsou

15.01.98

derivatizovány sulfonací, která blokuje tvorbu disulfidových vazeb. Protein je potom znovu složen ve slabém denaturantu, potom desulfonován, což umožní řádnou tvorbu disulfidových vazeb. Desulfonace probíhá za přítomnosti sulfhydrylové sloučeniny. Malé množství sloučenin korespondujících oxidované formě bude zajišťovat, aby vhodné disulfidové vazby zůstávaly intaktní. pH je změněno, t.j. zvýšeno, na hodnotu takovou, aby thiolová sloučenina byla alespoň částečně ionizována, což zvyšuje nukleofilní odstranění sulfonátu.

Tyto metody pro opětovné složení, ačkoliv jsou praktické pro své univerzální použití, nebyly významně účinné pro IGF-1 a jejich provedení je obtížné.

Byly popsány metody pro znovusložení, které jsou specifické pro IGF-1. PCT přihlášky WO 91/02807, WO 93/11240 a WO 93/19084 každá popisují metody pro znovusložení rekombinantně exprimovaného IGF-1 proteinu.

WO 91/02807 popisuje IGF-1 fúzní proteiny, ve kterých je na amino-konec IGF-1 fúzována pozitivně nabitá aminokyselinová sekvence. Aminoterminální adice se uplatňuje ve znovusložení, takže je dosažen přibližně 50% výnos řádně složeného proteinu. Tento přístup vyžaduje zvláštní krok štěpení amino-terminálního fúzního peptidu a purifikace pro získání nativního IGF-1.

WO 93/11240 popisuje způsob pro znovusložení IGF-1 proteinu v jednom roztoku obsahujícím chaotropické činidlo, organické rozpouštědlo a redukční činidlo při alkalickém pH,

15.01.93

takže je dosaženo více než 85% řádně složeného proteinu.

WO 93/19084 popisuje způsob pro znovusložení rekombinantně produkovaného IGF-1 za použití protokolu pro znovusložení o třech krocích. Nesprávně složený met-IGF-1, t.j. IGF-1 s amino-terminálním methioninem (tento methioninový zbytek musí být odstraněn pro získání zralého IGF-1) je solubilizován v denaturačním roztoku. Potom je přidáno oxidační agens pro vytvoření "redukčního" roztoku. Je přidáno další redukční činidlo pro zvýšení disulfidové výměny a roztok je inkubován přes noc. Tato metoda vede k zisku asi 30 % řádně složeného proteinu. Tento protein musí být dále zpracován pro odstranění aminoterminálního methioninového zbytku.

Nedávno poppsal Hober et al., ((1994) "Folding of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein", Biochemistry 33: 6758 - 6761) způsob pro znovusložení IGF-1, využívající přidání nativního IGFBP-1. Přidání nativního IGFBP-1 k redukovanému IGF-1 polypeptidu za redukčních podmínek vede k zisku nativního IGF-1 vyššímu než 89 %. Použití IGFBP-3 nebylo popsáno, ani nebylo popsáno použití IGFBP.

Všechny v oboru známé metody pro znovusložení vedou k zisku řádně složeného proteinu, který je signifikantně nižší než 100 %. Heterologní směs vzniklá z těchto metod musí být dále purifikována, kterýžto proces může být časově náročný a/nebo nákladný.

Existuje potřeba pro jednoduchou, rychlou a vysoce účinnou metodu pro znovusložení IGF a IGFBP-3 do řádné

konformace se správnými disulfidovými vazbami.

V souladu s tím je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout rychlou, vysoce účinnou metodu pro znovusložení IGF-1 a IGFBP-3 společným složením dvou polypeptidů, což vede k vysokému výnosu řádně složených proteinů. Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout jednoduchou, vysoce účinnou metodu pro produkci purifikovaných komplexů nativního IGF a IGFBP-3.

Patenty, patentové přihlášky a publikace citované v této přihlášce jsou zde uvedeny jako odkazy ve svém celku.

V jednom aspektu vynález poskytuje rychlou, vysoce účinnou metodu pro znovusložení IGF-1 a IGFBP-3 a dále poskytuje účinnou metodu pro získání nativních komplexů IGF-1/IGFBP-3. Vynález dále poskytuje metodu pro purifikaci nativního IGF-1 a nativního IGFBP-3 z nativních komplexů IGF-1/IGFBP-3.

V jiném aspektu vynález poskytuje rychlou, vysoce účinnou metodu pro znovusložení IGF-1, která vede k velmi vysokému výnosu nativního IGF-1.

V ještě jiném aspektu vynález poskytuje rychlou, vysoce účinnou metodu pro znovusložení IGFBP-3, která vede ke zvýšenému výnosu nativního IGFBP-3.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 ukazuje aminokyselinovou sekvenci lidského

IGF-1.

Obrázek 2 ukazuje nukleotidovou sekvenci kodující lidský IGF-1.

Obrázek 3 a obrázek 4 ukazují dvě alternativní aminokyselinové sekvence IGFBP-3.

Obrázky 5, 6 a 7 ukazují tři alternativní nukleotidové sekvence kodující IGFBP-3.

Obrázek 8 ukazuje nukleotidovou sekvenci kodující kvasinkovou ubiquitinovou hydrolasu (YUH).

Obrázky 9 a 10 ukazují výsledky ko-skládání IGF-1 a IGFBP-3. Plné čtverečky ukazují znovuskládání IGF-1 a IGFBP-3 samostatně, v příslušném pořadí, zatímco prázdné čtverečky reprezentují výsledky ze společného skládání.

Podstata vynálezu

Proteiny exprimované ve vysokých hladinách v rekombinantních expresních systémech často vykazují nízkou nebo nedetegovatelnou biologickou aktivitu díky chybnému složení a nesprávné tvorbě disulfidových vazeb. Předkládaný vynález poskytuje novou metodu pro rychlé znovusložení rekombinantně produkovaných IGF-1 a IGFBP-3 s extrémně vysokou účinností, za zisku nativního IGF-1 a IGFBP-3. V překvapujícím výsledku vynálezci zjistili, že oxidace směsi denaturovaných a redukovaných IGF-1 a IGFBP-3, t.j., společné skládání, (kombinace nesložených nebo nesprávně

složených IGF-1 s nesloženými nebo nesprávně složenými IGFBP-3 za denaturačních a redukčních podmínek, následovaná oxidací), vede k synergnímu zvýšení účinnosti skládání pro oba proteiny, za zisku téměř 100% nativního IGF-1 a velmi vysokého procenta nativního IGFBP-3. Vynálezci také neočekávaně zjistili, že kinetiky skládání byly významně pozměněny, zejména s ohledem na skládání IGFBP-3, což vede k významnému zkrácení času nutného pro skládání. Tyto výsledky byly zejména překvapivé, protože je známo, že disulfidová isomerasová aktivita (enzymatická aktivita, která vyžaduje rozrušení a novotvorbu disulfidových vazeb a která může asistovat ve znovuskládání proteinu) IGF-1 je inhibována přidáním ekvimolárního množství IGFBP-3 (Koedam and Leo van den Brande, výše).

Vynález také poskytuje účinné metody pro pro produkci purifikovaného nativního IGF, nativního IGFBP-3 a nativního komplexu IGF/IGFBP-3 z rekombinantních expresních systémů. Společné skládání IGF-1 a IGFBP-3 podle předkládaného vynálezu vede ke tvorbě nativních komplexů IGF-1/IGFBP-3. Tyto komplexy mohou být snadno izolovány od jakéhokoliv nesprávně složeného proteinu v reakci skládání za použití jednoduchých metod v oboru dobře známých. Pokud je to žádoucí, mohou být IGF-1 a IGFBP-3 snadno dále izolovány a purifikovány metodami v oboru dobře známými.

Definice

"Inzulinu podobný růstový faktor" nebo "IGF" zahrnuje rodinu faktorů, včetně, ale nejenom, IGF-1 a IGF-2. IGF je polypeptid s molekulovou hmotností okolo 7,5 kDa. IGF

zahrnuje přirozené IGF-1 nebo IGF-2, jejich analoga a varianty a fúze mezi IGF-1 nebo IGF-2 a jinými aminokyselinovými sekvencemi. IGF může být získán z přirozených zdrojů nebo může být připraven rekombinantními prostředky.

"Vazebný protein-3 pro inzulinu podobný růstový faktor" nebo "IGFBP-3" jak je zde použito je člen rodiny vazebných proteinů pro inzulinu podobný růstový faktor, která obsahuje, ale není omezena na, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, a IGFBP-6. IGFBP-3 může být získán z přirozených zdrojů nebo může být připraven rekombinantními prostředky. IGFBP-3 tvoří komplex s IGF a třetí molekulou známou jako ALS.

"Nativní IGF-1", jak je zde použito, je definován jako IGF-1, včetně přirozeně se vyskytujícího IGF-1, jeho analog a variant, který je správně složen a obsahuje pouze správné disulfidové vazby. Správné disulfidové vazby jsou tvořeny mezi aminokyselinovými zbytky C6-C48, C47-52, a C18-C61, nebo homology těchto aminokyselinových zbytků v analogách a variantách IGF-1. Nativní IGF-1 je biologicky aktivní.

"Nerozpustný IGF-1" označuje precipitovaný nebo agregovaný IGF-1, který je obsažen v hostitelské buňce, neb je jinak s hostitelskou buňkou asociován, a má biologicky inaktivní konformaci s nesprávnými nebo s nevytvořenými disulfidovými vazbami. Nerozpustný IGF-1 může být obsažen v inkluzních tělískách nebo refraktilních tělískách, t.j. může nebo nemusí být viditelný v mikroskopu s fázovým kontrastem.

"Nesprávně složený IGF-1" označuje IGF-1, který je v biologicky inaktivní konformaci s nesprávnými nebo s nevytvořenými disulfidovými vazbami. Nesprávně složený IGF-1 může být, ale nemusí být, nerozpustný.

"Nerozpustný IGFBP-3" označuje precipitovaný nebo agregovaný IGFBP-3, který je obsažen v hostitelské buňce, nebo je jinak s hostitelskou buňkou asociován, a má biologicky inaktivní konformaci s nesprávnými nebo s nevytvořenými disulfidovými vazbami. Nerozpustný IGFBP-3 může být obsažen v inkluzních tělíscích nebo refraktilních tělíscích, t.j. může nebo nemusí být viditelný v mikroskopu s fázovým kontrastem.

"Nesprávně složený IGFBP-3" označuje IGFBP-3, který je v biologicky inaktivní konformaci s nesprávnými nebo s nevytvořenými disulfidovými vazbami. Nesprávně složený IGFBP-3 může být, ale nemusí být, nerozpustný.

"Nativní IGFBP-3", jak je zde použito, je definován jako IGFBP-3, včetně přirozeně se vyskytujícího IGFBP-3, jeho analog a variant, který je správně složen a obsahuje pouze správné disulfidové vazby. Nativní IGFBP-3 je biologicky aktivní.

"Nativní IGF-1/IGFBP-3 komplex" jak je zde použito, je definován jako nekovalentně vázaný komplex nativního IGF-1 a nativního IGFBP-3.

"Redukční činidlo" jak je zde použito, je definováno jako jakákoliv sloučenina nebo materiál, který udržuje

sulfhydrylové skupiny v redukovaném stavu a redukuje intra- nebo intermolekulární disulfidové vazby. Přijatelná redukující činidla zahrnují, ale nejsou omezena na, dithiothreitol (DTT), 2-merkaptoethanol, dithioerythritol, cystein, cysteamin (2-aminoethanethiol), a redukovaný glutathion.

"Oxidační činidlo" jak je zde použito, je definováno jako jakákoliv sloučenina nebo materiál, který je schopen odstranění elektronu ze sloučeniny, která má být oxidována. Přijatelná oxidační činidla zahrnují, ale nejsou omezena na, oxidovaný glutathion, cystin, cystamin, oxidovaný dithiothreitol, oxidovaný erythreitol a kyslík.

"Denaturační činidlo" nebo "denaturant" jak je zde použito, je definováno jako jakákoliv sloučenina nebo materiál, který může způsobovat reverzibilní nesložení proteinu. Síla denaturačního činidla nebo denaturantu bude určena vlastnostmi a koncentrací jednotlivého denaturačního činidla nebo denaturantu. Přijatelná denaturační činidla nebo denaturanty mohou být chaotropy, detergenty, organická s vodou mísitelná rozpouštědla, fosfolipidy nebo kombinace dvou nebo více takových činidel. Přijatelné chaotropy zahrnují, ale nejsou tak omezeny, močovinu, guanidin a thiokyanát sodný. Vhodné detergenty mohou zahrnovat, ale nejsou tak omezeny, silné detergenty jako je dodecylsulfát sodný, nebo polyoxyethylenethery (např. Tween nebo Triton detergenty), mírné neiontové detergenty (např. digitonin), mírné kationtové detergenty jako je N-[2,3-(dioleoyoxy)-propyl]-N,N,N-trimethylamonium, mírné iontové detergenty (např. cholát sodný nebo deoxycholát

sodný) nebo zwitteriontové detergenty, zahrnující, ale takto neomezené, sulfobetainy (Zwittergent), 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamonio-1-propan-sulfát (CHAPS) a 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamonio-2-hydroxy-1-propan-sulfonát (CHAPSO). Jako denaturanty mohou být použita s vodou mísitelná organická rozpouštědla jako je acetonitril, nižší alkanoly (zejména C₂-C₄ alkanoly jako je ethanol nebo isopropano), nižší alkandiolů (zejména C₂-C₄-alkandiolů jako je ethylenglykol). Fosfolipidy vhodné v předloženém vynálezu mohou být přirozeně se vyskytující fosfolipidy jako je fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin, fosfatidylserin a fosfatidylinositol nebo syntetické fosfolipidové deriváty nebo varianty jako je dihexanoylfosfatidylcholin nebo diheptanoylfosfatidylcholin.

"Znovusložení" jak je zde použito popisuje jakýkoliv proces nebo způsob, který je vyvinut pro transformaci polypeptidu z jeho nesprávně složeného nebo nesloženého stavu do jeho nativní, správně složené konformace.

"Společné složení" jak je zde použito, označuje určité procesy, reakce nebo způsoby znovusložení, které využívají alespoň dvou polypeptidů, které interagují jeden s druhým a vedou k transformaci nesprávně složených nebo nesložených polypeptidů na nativní, správně složené polypeptidy.

Popis výhodných provedení

Předkládaný vynález spočívá v společném skládání IGF-1 a IGFBP-3, což vede k rychlému, vysoce účinnému znovusložení dvou proteinů, za zisku nativního IGF-1 a IGFBP-3, a dále

obsahuje zjednodušené metody pro purifikaci nativního IGF-1, IGFBP-3 a IGF-1/IGFBP-3 komplexu. Vynález může být proveden následujícím způsobem:

a) IGF-1 a IGFBP-3 jsou kombinovány v molárním poměru 1:3 až 3:1, potom jsou denaturovány a redukovány denaturačními a redukčními činidly, nebo alternativně, IGF-1 a IGFBP-3 jsou denaturovány a redukovány jednotlivě, potom kombinovány v molárním poměru 1:3 až 3:1 za tvorby IGF-1/IGFBP-3 komplexu;

b) potom je přidáno oxidační činidlo do směsi IGF-1/IGFBP-3 podle kroku (a);

c) popřípadě, IGF-1/IGFBP-3 komplex může být purifikován z IGF-1/IGFBP-3 směsi pro společné skládání; a

d) popřípadě, IGF-1 a IGFBP-3 mohou být jednotlivě purifikovány z komplexu.

IGF-1 a IGFBP-3 pro společné skládání podle předkládaného vynálezu mohou být produkovány v mnoha vysoce expresních systémech, za použití mnoha hostitelských buněk, včetně, ale nejenom, bakterií, kvasinek, hmyzích a savčích buněčných linií. Preferovaně jsou IGF-1 a IGFBP-3 produkovány v bakteriálních hostitelských buňkách. Lépe jsou IGF-1 a IGFBP-3 produkovány v *E. coli* hostitelských buňkách, včetně, ale nejenom, *E. coli* kmene W3110DE3.

Hostitelské buňky jsou transformovány expresními vektory obsahujícími DNA kodující IGF-1 nebo IGFBP-3. Hostitelské buňky mohou být transformovány mnoha technikami dobře v

oboru známými, jako je například, ale bez omezení, CaCl_2 pro bakteriální nebo kvasinkové hostitelské buňky, CaPO_4 pro hmyzí nebo savčí hostitelské buňky, nebo elektroporace, která může být použita pro jakýkoliv typ hostitelských buněk. Metody pro transformaci hostitelských buněk mohou být nalezeny v Sambrook et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) a Ausubel (1987) Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley and Sons, New York).

Expresní vektory obsahující DNA kodující IGF-1 nebo IGFBP-3 mohou být konstruovány standartními metodami dobře v oboru známými. DNA kodující IGF-1 nebo IGFBP-3 může být získána z přirozených zdrojů, jako jsou genomové nebo cDNA knihovny, nebo může být chemicky syntetizována. Dále, varianty IGF-1 nebo IGFBP-3 mohou být produkovány různými metodami dobře v oboru známými, včetně místně řízené mutagenese. Metody pro produkci variant mohou být nalezeny v Sambrook et al., výše a Ausubel et al., výše.

Transformované mikrobiální hostitelské kmeny jsou kultivovány v kapalném mediu obsahujícím asimilovatelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí, za použití metod, které jsou v oboru dobře známé. Transformované hmyzí nebo savčí buňky jsou kultivovány v kapalném mediu obsahujícím asimilovatelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí, a volitelně, obsahující vitaminy, aminokyseliny, růstové faktory a proteinové doplňky kultivace známé v oboru. Kapalně medium pro kultivaci hostitelských buněk může volitelně obsahovat antibiotika nebo antimykotika pro zabránění růstu nežádoucích mikroorganismů a/nebo sloučeniny obsahující, ale ne omezené na,

antibiotika pro selekci hostitelských buněk obsahujících expresní vektor.

IGF-1 a IGFBP-3 mohou být purifikovány z hostitelských buněk mnoha metodami v oboru známými. Normálně je IGF-1 nebo IGFBP-3 produkován v bakteriálních hostitelských buňkách slabě rozpustný nebo nerozpustný (ve formě inkluzních tělísek). V případě nerozpustného proteinu může být protein odebrán z lyzátu hostitelských buněk centrifugací. V případě slabě rozpustného proteinu mohou být přidány sloučeniny zahrnující, ale ne omezené na, polyethylenimin (PEI) pro vyvolání precipitace částečně rozpustného proteinu. Precipitovaný protein může být potom běžně odebrán centrifugací.

Nerozpustný nebo precipitovaný IGF-1 nebo IGFBP-3 mohou být potom solubilizovány kterýmkoliv z mnoha činidel v oboru známých. Preferovaně jsou IGF-1 nebo IGFBP-3 solubilizovány močovinou nebo guanidinhydrochlorid.

Pokud jsou IGF-1 nebo IGFBP-3 produkovány jako fúzní proteiny, pak může být fúzní sekvence volitelně odstraněna. Odstranění fúzní sekvence může být provedeno enzymatickým nebo chemickým štěpením, preferovaně enzymatickým štěpením. Enzymatické odstranění fúzní sekvence může být provedeno za použití metod v oboru dobře známých. Volba enzymu pro odstranění fúzní sekvence bude určena identitou fúze a reakční podmínky budou určeny volbou enzymu, jak bude odborníkům jasné. Štěpený IGF-1 nebo IGFBP-3 může být dále purifikován ze štěpené fúzní sekvence dobře známými metodami. Takové metody budou určeny identitou a charakterem fúzní sekvence jak je odborníkům jasné. Metody pro purifikaci mohou zahrnovat, ale nejsou

omezeny na, vylučovací chromatografii podle velikosti, hydrofobní interakční chromatografii, iontovýmennou chromatografii nebo dialýzu.

IGF-1 nebo IGFBP-3 je preferovaně dále purifikován pro odstranění DNA z proteinového roztoku. DNA může být odstraněna jakoukoliv z mnoha metod v oboru známých, jako je precipitace nebo iontová výměnná chromatografie, ale preferovaně je odstraněna precipitací s protaminsulfátem. IGF-1 nebo IGFBP-3 mohou být separovány od precipitované DNA za použití metod jako je centrifugace nebo filtrace.

IGF-1 nebo IGFBP-3 pro společné skládání podle předkládaného vynálezu mohou být použity přímo po odstranění DNA, nebo mohou být dále purifikovány a/nebo koncentrovány za použití metod v oboru dobře známých. Společné skládání relativně nečištěného (surového) IGF-1 a IGFBP-3 má výhodu zvýšeného výnosu a zjednodušené purifikace nativního komplexu IGF-1/IGFBP-3. Purifikace společně složeného komplexu vyžaduje pouze jeden purifikační protokol (oproti dvěma, pokud jsou dva polypeptidy purifikovány samostatně před společným skládáním), a umožňuje purifikačnímu protokolu využít vlastnosti nativního komplexu IGF-1/IGFBP-3.

Pokud je to žádoucí, mohou být IGF-1 a IGFBP-3 dále purifikovány. Purifikace IGF-1 a IGFBP-3 může být provedena za použití mnoha technik dobře v oboru známých, včetně hydrofobní interakční chromatografie, chromatografie s vylučováním podle velikosti, iontové výměnné chromatografie, kapalinové chromatografie s reverzní fází s vysokou rozlišovací schopností, afinitní chromatografie a podobně. Další purifikace může také

obsahovat krok sušení nebo precipitace purifikovaného proteinu. Pokud jsou IGF-1 nebo IGFBP-3 sušeny nebo precipitovány, pak mohou být proteiny kombinovány před znovurozpuštěním v denurantu, nebo mohou být znovu rozpuštěny jednotlivě a kombinovány pro společné skládání.

Denaturace IGF-1 a IGFBP-3 může být provedena za použití mnoha denaturačních činidel, jako je například, ale nejenom, močovina nebo guanidin. Preferovaně je denaturantem močovina. Denaturace může být provedena v procesu o jednom kroku, kde jsou IGF-1 a IGFBP-3 denaturovány s roztokem denurantu, který je v koncentraci použité pro společné skládání, nebo v procesu o dvou krocích, ve kterém jsou IGF-1 a IGFBP-3 denaturovány s vysokou koncentrací denurantu, po čemž následuje ředění, což vede ke vzniku roztoku obsahujícího koncentraci denurantu použitelnou pro proces spoluskládání. V jednokrokovém procesu denaturace je koncentrace denurantu, kterým je močovina, preferovaně 1 až 2 molární. Ve dvoukrokovém procesu denaturace je koncentrace denurantu, kterým je močovina, preferovaně 5 až 7 molární, kde tato koncentrace je preferovaně ředěna na asi 1 až 2 molární pro proces spoluskládání.

Redukce IGF-1 a IGFBP-3 může být provedena ve stejnou dobu jako denaturace, nebo, volitelně, může být provedena po denaturaci. Redukce IGF-1 a IGFBP-3 může být provedena za použití mnoha činidel, jako je například, ale nejenom, dithiothreitol (DTT), 2-merkapt ethanol, cystein, cysteamin (2-aminoethanethiol), nebo redukovaný glutathion. Preferovaně je redukčním agens DTT. Jak již bylo uvedeno pro denaturaci, redukce IGF-1 a IGFBP-3 může proces o jednom nebo o dvou krocích, kde jsou polypeptidy redukovány za použití koncentrace

redukčního agens použitelné pro proces spoluskládání nebo ve kterém jsou polypeptidy redukovány za použití vyšší koncentrace redukčního činidla, po čemž následuje ředění na koncentrace použitelné v procesu spoluskládání. Pokud je redukčním činidlem DTT, pak je vysoká koncentrace redukčního činidla preferovaně okolo 30 až 50 milimolární (mM) a koncentrace použitelná pro spoluskládání je preferovaně okolo 5 až 15 mM.

Roztok denaturovaného a redukováného IGF-1 a IGFBP-3 je potom oxidován pro vytvoření disulfidových vazeb. Přijatelná oxidační činidla zahrnují, ale nejsou omezeny na, glutathion, cystin a cystamin. Preferovaným oxidačním činidlem je cystamin.

Reakce společného skládání může pokračovat do nekonečna. Nicméně, vynálezci zjistili, že společné skládání IGF-1 a IGFBP-3 významně zrychluje kinetiku společného skládání. V souladu s tím, reakce může probíhat po významně kratší dobu, asi okolo 1 až 2 hodin. Preferovaně probíhá reakce společného skládání okolo 1 až 3 hodin.

Po dokončení reakce společného skládání může být purifikován nativní komplex IGF-1/IGFBP-3. Nativní komplex IGF-1/IGFBP-3 může být purifikován za použití mnoha metod, jako je například, ale nejenom, vylučování podle velikosti, iontovýměnná chromatografie a hydrofobní interakční chromatografie. Preferovaně je nativní komplex IGF-1/IGFBP-3 purifikován za použití kationtovýměnné chromatografie za použití sulfopropyl-derivatizované kolonové chromatografické matrice (např. SP-Sephadex, Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Popřípadě, nativní IGF-1 a IGFBP-3 mohou být dále purifikovány z komplexu za použití mnoha metod v oboru známých. Preferovaně jsou IGF-1

a IGFBP-3 purifikovány z komplexu disociací komplexu, preferovaně za acidických podmínek, po čemž následuje chromatografie s vylučováním podle velikosti. Purifikovaný komplex nebo IGF-1 nebo IGFBP-3 mohou být vyloučeny do různých pufrů a/nebo mohou být koncentrovány kteroukoliv z mnoha metod v oboru známých.

Následující příklady jsou míněny jako ilustrace předkládaného vynálezu. Příklady nejsou míněny jako omezení předkládaného vynálezu jakýmkoliv způsobem.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Expresní vektory obsahující IGF-1 a IGFBP-3 sekvence pro použití v produkci IGF-1 a IGFBP-3.

Expresní konstrukty použité pro produkci IGF-1 a IGFBP-3 jsou stejné jako pJU1002 a pJU1003 (Squires et al., výše, J. Biol. Chem., 263: 16297 - 16302) kromě toho, že geny insertované downstream od translačního spojovníku jsou ubiquitin-IGF (pER10088) a IGFBP-3 (pDJ12833). Kromě toho, pER10088 a pDJ12833 se liší od pJU1003 v tom, že neobsahují syntetickou 16 bp adaptorovou sekvenci na 5' konci tet genu v tomto plasmidu; ale obsahují DNA inserce v jedinečném PvuII místě v od pBR322 odvozené kostře: pER10088 obsahuje linker 5'...CCTCGAGG...3' v tomto umístění; pDJ12833 obsahuje 385 bp fragment nesoucí par lokus pSC101 (Meacock and Cohen (1980), Cell 20: 529 - 542).

pER10088 obsahuje otevřený čtecí rámeček (ORF) obsahují (ve směru 5' ...3') ATG triplet (iniciace), 76 kodonů kvasinkového ubiquitinu, 70 syntetických kodonů zralého lidského inzulinu

podobného faktoru 1, a terminační kodon.

pDJ12833 obsahuje ORF obsahující ATG triplet následovaný 264 kodony zralého lidského IGFBP-3. Aminoterminálních 95 kodonů je syntetických; zbytek byl odvozen od přirozené cDNA pro tento gen.

V každém případě, ORF je umístěn ve vztahu k translačnímu spojovníku přesně tak, jak popisuje Squires et al., (1988) pro fibroblastový růstový faktor.

Příklad 2 - Rekombinantní produkce IGF-1

IGF-1 může být produkován za použití konstruktů expresních vektorů jako jsou ty, které jsou popsány v příkladu 1. Expresní konstrukt pro produkci IGF-1 fúzního proteinu (PER10088) byl zaveden do E. coli kmene W3110DE3 za použití transfekce chloridem vápenatým (Sambrook, výše).

W3110DE3/PER10088 byly kultivovány ve 100 litrech kapalně kultury při 37 °C dokud kultura nedosáhla optické hustoty alespoň 25 při 600 nm (OD₆₀₀). Exprese IGF-1 byla indukována přidáním isopropylthiogalaktosidu (IPTG) v koncentraci 0,4 mM. Indukované bakterie byly dále kultivovány a potom shromážděny centrifugací. Peletované buňky byly resuspendovány v pufru octanu sodného (50 mM, pH 5,5) s ethylendiamintetraacetátem (EDTA). Bakterie byly lyzovány za použití Microfluidizeru^R (model M-210-EH, Microfluidics Corp.). Protože ne všechen IGF-1 fúzní protein produkováný v těchto hostitelských buňkách je nerozpustný, byl přidán polyethyleneimin (PEI) v koncentraci 0,1% pro precipitaci solubilního a částečně solubilního IGF-1 fúzního proteinu.

Nerozpustný a precipitovaný IGF-1 fúzní protein byl odebrán centrifugací, potom promyt jedenkrát 2 M močoviny, 50 mM fosforečnanem sodným, 2 mM DTT, pH 5,8 - 5,9 a znovu oddělen centrifugací. IGF-1 peleta byla potom solubilizována 6 M močoviny, 20 mM Tris, 30 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0. DNA byla precipitována z roztoku přidáním protaminsulfátu v konečné koncentraci 0,14 %. Precipitovaná DNA byla odstraněna centrifugací a supernatant obsahující IGF-1 fúzní protein byl dále purifikován iontovýměnnou chromatografií na Q-Sepharose. IGF-1 fúzní protein byl tráven ubiquitin hydrolasou (která byla získána z *E. coli* expresí pER1011, expresního vektoru, kodujícího kvasinkovou ubiquitin hydrolasu (sekvence kodující kvasinkovou ubiquitin hydrolasu je ukázána na obrázku 8), po čemž následovala purifikace podle Liu et al., ((1989), *J. Biol. Chem.*, 264: 20331 - 20338) (PER1011 je analogem pJU1002 kromě přítomnosti 5'...CCTCGAGG...3'linkeru v PvuII místě), za zisku zralého IGF-1.

IGF-1 byl potom denaturován a znovu složen v 2M močovíně, 10 milimolárním DTT a 20% ethanolu za přítomnosti 10 milimolárního cystaminu. IGF-1 byl dále purifikován kationtovou výměnnou chromatografií na SP-Sepharose a kapalinové chromatografie s reverzní fází s vysokou rozlišovací schopností (RP-HPCL) na C₁₈ koloně (Vydac).

Příklad 3 - Rekombinantní produkce IGFBP-3

IGFBP-3 může být produkován za použití konstruktů expresních vektorů jako jsou ty, které jsou popsány v příkladu 1. Expresní konstrukt pro produkci IGFBP-3 PDJ12833 byl zaveden do *E. coli* kmene W3110DE3 a klony byly izolovány, za

použití metod v oboru dobře známých (jako jsou ty, které jsou popsány v Sambrook, výše, nebo Ausubel, výše).

Klon W3110DE3/PER10088 byl kultivován ve 100 litrech kapalně kultury při 37 °C dokud kultura nedosáhla optické hustoty alespoň 25 při 600 nm (OD_{600}). Exprese IGFBP-3 byla indukována přidáním isopropylthiogalaktosidu (IPTG) v koncentraci 0,4 mM. Indukované bakterie byly dále kultivovány a potom shromážděny centrifugací. Peletované buňky byly resuspendovány v pufru octanu sodného (50 mM, pH 5,5) s ethylendiamintetraacetátem (EDTA). Bakterie byly lyzovány za použití Microfluidizeru^R (model M-210-EH, Microfluidics Corp.).

Nerozpustný IGFBP-3 byl odebrán centrifugací, potom promyt jedenkrát 2 M močoviny, 50 mM fosforečnanem sodným, 2 mM DTT, pH 5,8 - 5,9 a znovu oddělen centrifugací. IGFBP-3 peleta byla potom solubilizována 6 M guanidinium.HCl, 100 mM Tris, 25 mM DTT, 5 mM EDTA, pH 8,0, a potom byl roztok obsahující IGFBP-3 ředěn 1 objemem 100 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0. DNA byla precipitována z roztoku přidáním protaminsulfátu v konečné koncentraci 0,14 %. Precipitovaná DNA byla odstraněna centrifugací a supernatant obsahující IGFBP-3 byl dále ředěn 50 mM Tris, pH 10,6. IGFBP-3 byl znovu skládán přes noc po přidání cystaminu v konečné koncentraci 6 mM.

Roztok IGFBP-3 byl koncentrován ultrafiltrací, potom bylo rozpouštědlo odděleno diafiltrací proti 2M močovině, 20 mM Tris, pH 7. IGFBP-3 byl purifikován iontovou výměnnou chromatografií na Q-Sepharose následované SP-Sepharosou. IGFBP-3 byl dále purifikován RP-HPCL za použití C₁₈ kolony (Vydac).

15.01.98

Příklad 4 - Společné skládání IGF-1 a IGFBP-3

Rekombinantně produkované IGF-1 a IGFBP-3 byly smíseny v ekvimolárním poměru a potom sušeny lyofilizací. Směs sušených proteinů byla potom rozpuštěna v denaturačním/redukčním pufru (80 mM Tris, pH 8,3, 1,5 M močovina, 1 mM EDTA, 10 mM DTT) na konečnou koncentraci proteinu 1 mg/ml. Byl přidán hydrochlorid cystaminu v konečné koncentraci 10 mM cystaminu. Kontrolami byli IGF-1 skládáný samostatně a IGFBP-3 skládáný samostatně. Reakce společného skládání a znovuskládání byly inkubovány při 5 °C. Vzorky byly odebírány ihned před (0 hodin), a 1, 2, 3 a 4 hodiny po přidání cystaminu a byly analyzovány RP-HPLC. RP-HPLC analýza v hodinu 0 ukázala, že oba IGF-1 a IGFBP-3 byly plně redukovány. RP-HPLC byla provedena na Waters 626-1 HPLC přístroji na Poros R2/H koloně (průměr 4,6 mm, délka 100 mm) za použití lineárního gradientu acetonitrilu (s 0,1% kyselinou trifluoroctovou) probíhající od 13,5% do 54% acetonitrilu.

IGF-1 a IGFBP-3 skládané samostatně dávaly chabý výnos nativního proteinu. IGF-1 skládáný samostatně dával výnos pouze 13% a IGFBP-3 skládáný samostatně dával výnos 45,1% nativního proteinu. Oproti tomu, při společném skládání, v podstatě všechen (99,6%) IGF-1 a většina IGFBP-3 (83%) byly řádně složeny. Tyto výsledky ukazují, že společné skládání IGF-1 a IGFBP-3 vede k synergnímu zvýšení výnosu nativních IGF-1 a IGFBP-3.

Další analýzy reakcí společného skládání ukázaly, že kromě zvýšení výnosu nativních proteinů mění společné skládání také kinetiku opětovného skládání. Obrázky 9 a 10 ukazují časový průběh znovuskládání IGF-1 a IGFBP-3 buď samostatně, nebo v

15.01.98

reakci společného skládání. Proces společného skládání zvyšuje počáteční stupeň znovuskládání a maximální stupeň znovuskládání, stejně jako celkový výnos znovuskládání.

Příklad 5 - Testy na bioaktivitu společně složených IGF-1 a IGFBP-3

Tento příklad ukazuje, že IGF-1, IGFBP-3 a komplex IGF-1/IGFBP-3 znovu složené podle předkládaného vynálezu mají biologickou aktivitu.

MG63 buňky lidského osteosarkomu (5×10^5 buněk) jsou umístěny do T-175 nádob a jsou kultivovány v buněčném kultivačním mediu (RPMI medium doplněné 10% fetálním hovězím sérem, 50 jednotek/ml penicilinu, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, neesenciální aminokyseliny a 2 mM L-glutaminu). Nádoba je inkubována při 37 °C ve zvlhčované atmosféře 5 % CO_2 /95 % vzduchu po 2 až 3 dny. Před tím, než se kultura buněk stane konfluentní, jsou buňky odděleny z nádob inkubací buněk v roztoku trypsin/EDTA. Buněčné kultivační medium (6 ml) je přidáno pro ukončení trypsinu a buňky jsou transferovány do centrifugační trubice. Buňky jsou centrifugovány při 800 x g po 5 - 10 minut a jsou resuspendovány v 10 ml testovacího media (RPMI medium doplněné 50 jednotkami/ml penicilinu, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, neesenciálními aminokyselinami, 2 mM L-glutaminu, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ hovězího fibronektinu, 5 $\mu\text{g/ml}$ lidského transferinu, 75 $\mu\text{g/ml}$ ovalbuminu a 3 μM dexamethasonu).

Vzorky IGF-1 referenčního standardu a společně skládaných IGF-1 a IGFBP-3 jsou seriově ředěny v testovacím mediu v 96-jamkových plotnách. Komplex IGF-1/IGFBP-3, IGF-1 a IGFBP-3

znovusložené metodou společného skládání jsou testovány každý. Každá jamka obsahuje 50 μ l standardu nebo testovaného vzorku. Rozsah koncentrace pro IGF-1 referenční standard je 0,244 - 500 ng/ml.

MG63 buňky lidského osteosarkomu, které byly připraveny v testovacím mediu, jsou umístěny v počtu 5000 buněk/jamku, v objemech 50 μ l/jamku. Celkový objem v každé jamce je 100 μ l. Plotny jsou potom inkubovány v humidifikované atmosféře 5 % CO₂/95 % vzduch po 4 dny při 37 °C.

V konci inkubační periody je buněčný růst testován měřením aktivity kyselé fosfatasy, která je úměrná počtu osteosarkomových buněk. Plotny jsou vyndány z inkubátoru a kultivační medium je aspirováno z jamek. Každá jamka je propláchnuta 200 μ l fosfátem pufrovaného salinického roztoku. Do každé jamky je přidáno 100 μ l 10 mM p-nitrofenyl fosfátu, 100 mM octanu sodného, 1 % Tritonu X-100, pH 5,5 a plotna je inkubována při 37 °C po 2 hodiny. Hydrolyza p-nitrofenyl fosfátu kyselými fosfatasami je ukončena přidáním 10 μ l 1,0N hydroxidu sodného do každé jamky. Plotny jsou inkubovány při pokojové teplotě po dobu minimálně 10 minut. Je měřena absorbance při 405 nm, zatímco referenční absorbance je při 490 nm.

Absorbance pozadí je odečtena od absorbance každé jamky. Průměrná absorbance je zakreslena jako funkce koncentrace IGF-1. ED₅₀, koncentrace IGF-1 při které je hodnota absorbance polovinou maximální absorbance, je kalkulována pro každý vzorek a referenční standart z grafu dávka - odpověď. Aktivita každého vzorku je vyjádřena jako poměr ED₅₀ IGF-1 referenčního

standardu a vzorku.

Předkládaný vynález byl upřesněn jak přímým popisem, tak příklady. Ekvivalenty a modifikace předkládaného vynálezu budou odborníkům zřejmé, a spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

16.01.98

3016

P A T E N T O V É N A R O K Y

1. Způsob produkce komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3
v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

denaturaci směsi IGF-1 a IGFBP-3;
redukci uvedené směsi IGF-1 a IGFBP-3,
což vytvoří roztok
redukovaného, denaturovaného IGF-1 a IGFBP-3;
přidání oxidačního činidla do uvedené směsi IGF-1 a
IGFBP-3; a
tvorbu komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3.

2. Způsob produkce komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3
v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

denaturaci IGF-1;
redukci uvedeného IGF-1, což vede k produkci
denaturovaného, redukovaného IGF-1;
denaturaci IGFBP-3;
redukci uvedeného IGFBP-3, což vede k produkci
denaturovaného, redukovaného IGFBP-3;
smísení uvedeného denaturovaného, redukovaného IGF-1 a
uvedeným denaturovaným, redukovaným IGFBP-3, což vede ke tvorbě
směsi denaturovaných, redukovaných IGF-1 a IGFBP-3;
přidání oxidačního činidla k uvedené směsi
denaturovaných, redukovaných IGF-1 a IGFBP-3; a tvorbu komplexu
nativního IGF-1 a IGFBP-3.

3. Způsob produkce komplexu nativních IGF-1 a IGFBP-3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:
- denaturaci IGF-1 za vytvoření denaturovaného IGF-1;
 - denaturaci IGFBP-3 za vytvoření denaturovaného IGFBP-3;
 - smísení uvedeného denaturovaného IGF-1 a uvedeným denaturovaným IGFBP-3 za vytvoření směsi denaturovaných IGF-1 a IGFBP-3;
 - redukci uvedené směsi denaturovaných IGF-1 a IGFBP-3 za vytvoření denaturované, redukované směsi IGF-1 a IGFBP-3;
 - přidání oxidačního činidla k uvedené denaturované, redukované směsi IGF-1 a IGFBP-3; a
 - tvorbu komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3.
4. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje izolaci uvedeného komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3 z uvedené směsi IGF-1 a IGFBP-3.
5. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje izolaci nativního IGF-1 z uvedeného komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3.
6. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje izolaci nativního IGFBP-3 z uvedeného komplexu nativního IGF-1 a IGFBP-3.
7. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok ředění uvedené směsi denaturovaných, redukovaných IGF-1 a IGFBP-3 před přidáním uvedeného oxidačního činidla.
8. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m,

že uvedená směs IGF-1 a IGFBP-3 je v molárním poměru asi 1:3 až 3:1.

9. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená směs IGF-1 a IGFBP-3 je v molárním poměru asi 1,5:1 až 1:1,5.

10. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená směs IGF-1 a IGFBP-3 je denaturována močovinou nebo guanidinem, uvedená směs IGF-1 a IGFBP-3 je redukována dithiothreitem, 2-merkaptoethanolem, dithioerythritolem, cysteinem, cysteaminem, nebo redukováným glutathionem, a uvedeným oxidačním činidlem je cystin, cysteamin, kyslík, oxidovaný dithiothreitol, oxidovaný dithioerythritol nebo oxidovaný glutathion.

11. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená směs IGF-1 a IGFBP-3 je denaturována močovinou v koncentraci asi 1 až 2 molární, uvedená směs IGF-1 a IGFBP-3 je redukována dithiothreitem v koncentraci asi 5 až 15 milimolární a uvedené oxidační činidlo je cystamin v koncentraci asi 5 až 15 milimolární.

12. Způsob produkce komplexu nativních IGF-1 a IGFBP-3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

- denaturaci IGF-1;
- redukci uvedeného IGF-1;
- přidání nativního IGFBP-3 za vytvoření roztoku IGFBP-3 a redukováného, denaturovaného IGF-1;
- přidání oxidačního činidla do uvedené směsi IGF-1 a

IGFBP-3; a

vytvoření komplexu nativních IGF-1 a IGFBP-3.

13. Způsob produkce komplexu nativních IGF-1 a IGFBP-3
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

denaturaci IGFBP-3;

redukci uvedeného IGFBP-3;

přidání nativního IGF-1 za vytvoření roztoku IGF-1 a
redukovaného, denaturovaného IGFBP-3;

přidání oxidačního činidla do uvedené směsi IGF-1 a
IGFBP-3; a

vytvoření komplexu nativních IGF-1 a IGFBP-3.

16.01.98

3016

1/10

GPETLCGAEL VDALQFVCGD RGFYFNKPTG YGSSSRRAPQ 40

TGIVDECCFR SCDLRRLEMY CAPLKPAKSA 70

Obrázek 1

2/10

GASSAGLGPV	VRCEPCDARA	LAQCAPPNAV	CAELVREPGC	40
GCCLTCLASE	GQPCGIYTER	CGSGLRCQPS	PDEARPLQAL	80
LDGRGLCVNA	SAVSRLRAYL	LPAPPAPGNA	SESEEDRSAG	120
SVESPSVSST	HRVSDPKFHP	LHSKIIIIKK	GHAKDSQRYK	160
VDYESQSTDT	QNFSSSESKRE	TEYGPCRREM	EDTLNHLKFL	200
NVLSPRGVHI	PNCDKKGfYK	KKQCRPSKGR	KRGFCWCVDK	240
YGQPLPGYTT	KGKEDVHCYS	MQSK		264

Obrázek 2

16.01.98

3/10

GASSGGLGPV	VRCEPCDARA	LAQCAPPPAV	CAELVREPGC	40
GCCLTCLSE	GQPCGIYTER	CGSGLRCQPS	PDEARPLQAL	80
LDGRGLCVNA	SAVSRLRAYL	LPAPPAPGNA	SESEEDRSAG	120
SVESPSVSST	HRVSDPKFHP	LHSKIIIIKK	GHAKDSQRYK	160
VDYESQSTDT	QNFSSSESKRE	TEYGPCRREM	EDTLNHLKFL	200
NVLSPRGVHI	PNCDKKGFYK	KKQCRPSKGR	KRGFCWCVDK	240
YGQPLPGYTT	KGKEDVHCYS	MQSK		264

Obrázek 3

4/10

ATGCAGATTT	TCGTCAAGAC	TTTGACCGGT	AAAACCATAA	40
CATTGGAAGT	TGAATCTTCC	GATACCATCG	ACAACGTTAA	80
GTCGAAAATT	CAAGACAAGG	AAGGTATCCC	TCCAGATCAA	120
CAAAGATTGA	TCTTTGCCGG	TAAGCAGCTA	GAAGACGGTA	160
GAACGCTGTC	TGATTACAAC	ATTCAGAAGG	AGTCCACCTT	200
ACATCTTGTG	CTAAGGCTCC	GCGGTGGTGG	TCCGGAAACC	240
CTGTGCGGTG	CTGAACTGGT	TGACGCTCTG	CAGTTCGTTT	280
GCGGTGACCG	TGGTTTCTAC	TTCAACAAAC	CGACCGGTTA	320
CGGTTCCCTCC	TCCCGTCGTG	CTCCGCAGAC	CGGTATCGTT	360
GACGAATGCT	GCTTCCGGTC	CTGCGACCTG	CGTCGTCTGG	400
AAATGTACTG	CGCTCCGCTG	AAACCGGCTA	AATCCGCTTA	440
A				441

Obrázek 4

5/10

ATGGGTGCAT	CTTCTGCAGG	TTTAGGTCCA	GTTGTTCNTT	40
GTGAACCATG	TGATGCTCGT	GCTCTTGCTC	AATGTGCTCC	80
ACCACCAGCT	GTTTGTGCTG	AACTTGTTTCG	TGAACCGGGT	120
TGTGGTTGTT	GTCTGACTTG	TGCTCTTTCT	GAAGGTCAAC	160
CATGTGGTAT	TTATACTGAA	CGTTGTGGTT	CTGGTCTGCG	200
TTGTCAACCA	TCTCCAGATG	AAGCTCGTCC	TCTGCAGGCT	240
CTGCTGGACG	GTCGTGGTCT	GTGCGTTAAC	GCTTCCGCTG	280
TTTCCCGTCT	GCGCGCCTAC	CTGCTGCCAG	CGCCGCCAGC	320
TCCAGGAAAT	GCTAGTGAGT	CGGAGGAAGA	CCGCAGCGCC	360
GGCAGTGTGG	AGAGCCCGTC	CGTCTCCAGC	ACGCACCGGG	400
TGTCTGATCC	CAAGTTCCAC	CCCCTCCATT	CAAAGATAAT	440
CATCATCAAG	AAAGGGCATG	CTAAAGACAG	CCAGCGCTAC	480
AAAGTTGACT	ACGAGTCTCA	GAGCACAGAT	ACCCAGAACT	520
TCTCCTCCGA	GTCCAAGCGG	GAGACAGAAT	ATGGTCCCTG	560
CCGTAGAGAA	ATGGAAGACA	CACTGAATCA	CCTGAAGTTC	600
CTCAATGTGC	TGAGTCCCAG	GGGTGTACAC	ATTCCCAACT	640
GTGACAAGAA	GGGATTTTAT	AAGAAAAAGC	AGTGTCGCCC	680
TTCCAAAGGC	AGGAAGGGGG	GCTTCTGCTG	GTGTGTGGAT	720
AAGTATGGGC	AGCCTCTCCC	AGGCTACACC	ACCAAGGGGA	760
AGGAGGACGT	GCACTGCTAC	AGCATGCAGA	GCAAGTAG	798

6/10

GGTGCTTCTT	CTGCTGGTCT	TGGACCAGTT	GTTCGTTGTG	40
AACCATGTGA	TGCACGAGCT	TTAGCTCAAT	GTGCTCCACC	80
ACCAGCTGTT	TGTGCTGAAT	TAGTTCGAGA	ACCAGGTTGT	120
GGTTGTTGTT	TAACTTGTGC	TTTATCTGAA	GGTCAACCAT	160
GTGGTATTTA	TACTGAACGT	TGCGGTAGTG	GTTTGCGTTG	200
TCAACCAAGC	CCAGATGAAG	CTAGGCCTTT	ACAAGCATT	240
TTAGATGGTC	GAGGTCTGTG	TGTTAATGCG	TCCGCTGTTT	280
CTCGATTGCG	CGCTTATTTA	TTACCTGCCC	CACCGGCACC	320
GGGTAACGCC	TCCGAAAGCG	AAGAGGATCG	TTCTGCGGGT	360
TCCGTTGAAT	CTCCAAGTGT	GAGTTCTACC	CATCGAGTTA	400
GCGACCCGAA	ATTTTCATCCG	TTGCACTCTA	AAATCATTAT	440
TATTAAAAAG	GGTCACGCAA	AGGATTCTCA	ACGTTATAAG	480
GTGGATTATG	AAAGCCAATC	TACCGACACT	CAAATTTT	520
GTAGTGAAAG	TAAACGTGAA	ACCGAGTACG	GCCCGTGTCG	560
ACGTGAGATG	GAGGATACCT	TAAACCATTT	AAAATTTT	600
AACGTTTTAT	CCCCGCGTGG	CGTTCATATC	CCGAATTGCG	640
ATAAAAAAGG	CTTCTACAAA	AAGAAACAAT	GCCGTCCGAG	680
TAAGGGTCGT	AAACGAGGTT	TTTGTTGGTG	CGTTGACAAA	720
TACGGTCAAC	CGTTGCCGGG	TTATACTACT	AAAGGCAAAG	760
AAGATGTTCA	TTGTTATTCT	ATGCAATCTA	AATAATGCAT	800
CTCGAGAATT	C			811

7/10

ATGCAGCGGG	CGCGACCCAC	GCTCTGGGCC	GCTGCGCTGA	40
CTCTGCTGGT	GCTGCTCCGC	GGGCCGCCGG	TGGCGCGGGC	80
TGGCGCGAGC	TCGGCGGGCT	TGGGTCCCGT	GGTGCGCTGC	120
GAGCCGTGCG	ACGCGCGTGC	ACTGGCCCAG	TGCGCGCCTC	160
CGCCCGCCGT	GTGCGCGGAG	CTGGTGCGCG	AGCCGGGCTG	200
CGGCTGCTGC	CTGACGTGCG	CACTGAGCGA	GGGCCAGCCG	240
TGCGGCATCT	ACACCGAGCG	CTGTGGCTCC	GGCCTTCGCT	280
GCCAGCCGTC	GCCCGACGAG	GCGCGACCGC	TGCAGGCGCT	320
GCTGGACGGC	CGCGGGCTCT	GCGTCAACGC	TAGTGCCGTC	360
AGCCGCCTGC	GCGCCTACCT	GCTGCCAGCG	CCGCCAGCTC	400
CAGGAAATGC	TAGTGAGTCG	GAGGAAGACC	GCAGCGCCGG	440
CAGTGTGGAG	AGCCCGTCCG	TCTCCAGCAC	GCACCGGGTG	480
TCTGATCCCA	AGTTCCACCC	CCTCCATTCA	AAGATAATCA	520
TCATCAAGAA	AGGGCATGCT	AAAGACAGCC	AGCGCTACAA	560
AGTTGACTAC	GAGTCTCAGA	GCACAGATAC	CCAGAACTTC	600
TCCTCCGAGT	CCAAGCGGGA	GACAGAATAT	GGTCCCTGCC	640
GTAGAGAAAT	GGAAGACACA	CTGAATCACC	TGAAGTTCCT	680
CAATGTGCTG	AGTCCCAGGG	GTGTACACAT	TCCCAACTGT	720
GACAAGAAGG	GATTTTATAA	GAAAAAGCAG	TGTCGCCCTT	760
CCAAAGGCAG	GAAGCGGGGC	TTCTGCTGGT	GTGTGGATAA	800
GTATGGGCAG	CCTCTCCAG	GCTACACCAC	CAAGGGGAAG	840
GAGGACGTGC	ACTGCTACAG	CATGCAGAGC	AAGTAG	876

18.01.98

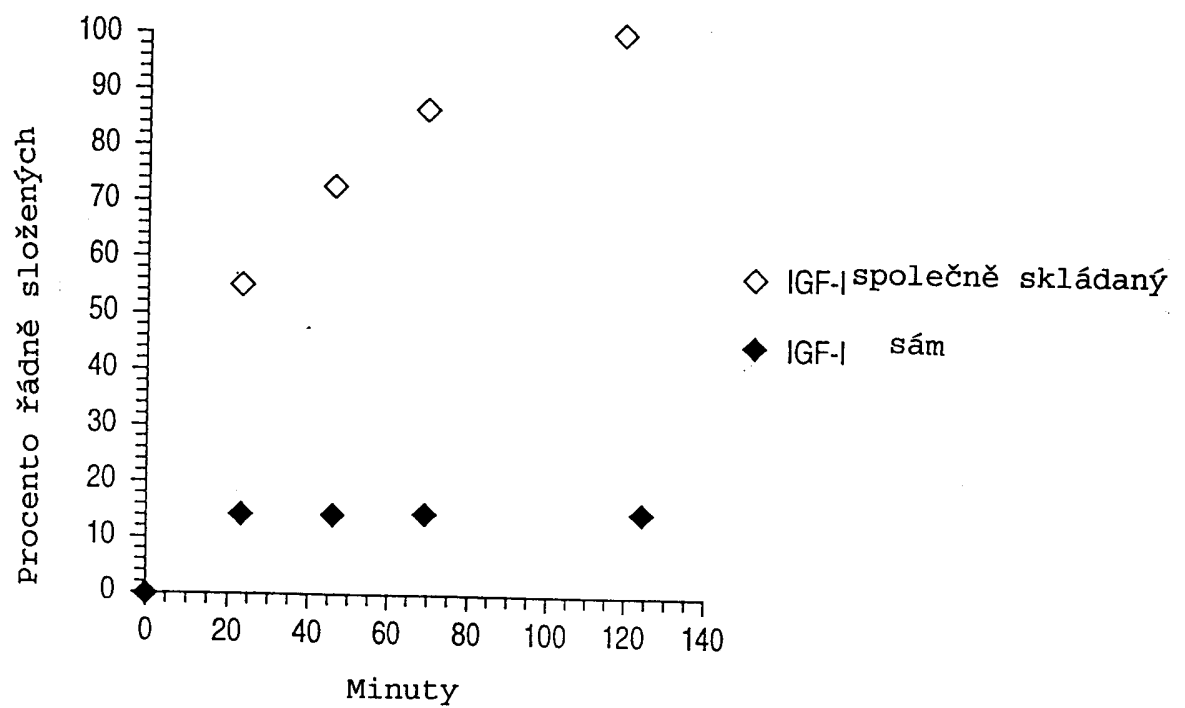
8/10

ATGAGCGGAG	AAAATCGTGC	TGTGGTGCCG	ATTGAATCAA	40
ACCCTGAAGT	TTTTACAAAT	TTTGCACATA	AATTAGGTTT	80
AAAAAATGAA	TGGGCGTATT	TCGATATCTA	TAGCTTAACA	120
GAGCCAGAGT	TACTAGCATT	CTTACCAAGG	CCAGTGAAGG	160
CCATTGTGCT	GCTATTTCCG	ATAAACGAGG	ATAGAAAATC	200
GAGTACCAGT	CAACAAATTA	CAAGTTCTTA	TGATGTTATA	240
TGGTTTAAGC	AATCAGTCAA	AAATGCGTGC	GGATTGTATG	280
CAATTCTTCA	TTCTTTGAGC	AATAACCAGT	CATTGTTGGA	320
GCCCGGCTCC	GACTTGGACA	ATTTTTTAAA	ATCTCAAAGT	360
GATACTTCAA	GCTCGAAGAA	TAGGTTTGAT	GATGTTACTA	400
CCGACCAATT	CGTCTTGAAT	GTAATAAAAG	AGAATGTACA	440
AACATTTTCT	ACTGGCCAGT	CAGAAGCACC	AGAAGCAACT	480
GCAGATACTA	ATCTACACTA	TATCACATAT	GTGGAAGAGA	520
ACGGAGGGAT	ATTTGAACTG	GATGGAAGGA	ATTTGAGCGG	560
ACCCCTCTAT	TTGGGAAAGA	GTGACCCAAC	TGCCACCGAT	600
TTGATTGAAC	AGGAATTAGT	TAGAGTGAGA	GTCGCCTCAT	640
ATATGGAAAA	TGCAAATGAA	GAAGATGTAT	TAAACTTTGC	680
TATGCTAGGA	TTGGGCCCTA	ATTGGGAATA	A	711

Obrázek 8

15.01.98

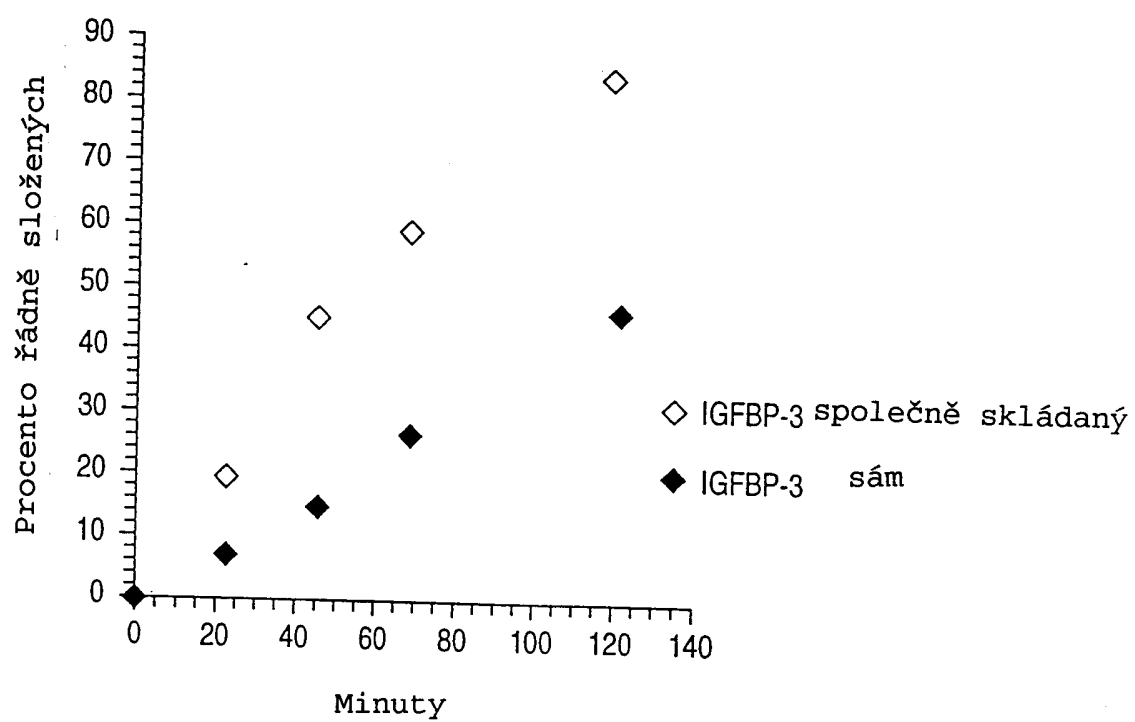
9/10



Obrázek . 9

15.01.98

10/10



Obrázek . 10