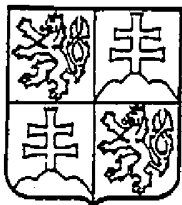


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00499-92

(13) A3

5(51) C 07 K 15/04

(22) 20.02.92

(32) 21.02.91

(31) 91/4105480

(33) DE

(40) 16.09.92

(71) Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim-Waldhof, DE

(72) Ambrosius Dorothea dr. rer. nat., Iffeldorf, DE  
Dony Carola dr. rer. nat., Starnberg, DE  
Rudolph Rainer dr. rer. nat., Weilheim, DE

(54) Způsob aktivace rekombinantních bílkovin

(57) Způsob aktivace rekombinantních bílkovin, které se alespoň z části nacházejí v neaktivní formě. Postup spočívá v tom, že se aktivuje solubilizací a/nebo renaturačním způsobem bílkovina, která obsahuje ve svém N- a/nebo C-terminálním zakončení ještě pomocný řetězec o 2 až 50 aminokyselinách, přičemž relativní hydrofobnost těchto pomocných řetězců, vypočtená jako součet uvedené relativní hydrofobnosti v tabulce 1 pro jednotlivé aminokyseliny, má zápornou hodnotu.

009571	20. II. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	

Způsob aktivace rekombinantních bílkovin

### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu aktivace rekombinantních bílkovin, zejména aktivace rekombinantních bílkovin z prokaryotických organismů.

### Dosavadní stav techniky

Při expresi rekombinantních bílkovin v prokaryotických organismech vznikají bílkoviny v produkční buňce často jako alespň částečně neaktivní, nesnadno rozpustné agregáty (refraktilní tělíška, inklusní tělíška, IB), které jsou mimoto ještě znečištěny bílkovinami produkční buňky. Než je možno takové bílkoviny použít například k léčebným nebo diagnostickým účelům, je nutno je převést na aktivní formy.

Způsoby renaturace rekombinantních bílkovin jsou obecně známé a byly popsány například v evropském patentovém spisu č. 114 506 a 241 022, ve WO 86/00610 a 84/03711 a v US patentovém spisu č. 4 530 787. Při provádění těchto známých postupů se však dosahují často při aktivaci přírodních řetězců bílkovin nízké výtěžky. Vynález si proto klade za úkol navrhnout postup, při němž by bylo možno dosáhnout zvýšení výtěžků při renaturaci rekombinantních bílkovin. Zásadní možnost může spočívat například ve změně podmínek při renaturaci. Této možnosti však nebylo při vypracování způsobu podle vynálezu použito.

### Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v překvapujícím zjištění, že se výtěžek bílkoviny při její renaturaci zvýší v případě, že se na její N- a/nebo C-terminální zakončení naváže ještě další pomocný řetězec.

Podstatou vynálezu je tedy způsob aktivace rekombinantních bílkovin, zvláště rekombinantních bílkovin z prokaryotických organismů, které se nacházejí alespoň z části v neaktivní formě, postup spočívá v tom, že se aktivuje solubilizačním a/nebo renaturačním způsobem bílkovina, která obsahuje na svém N- a/nebo C-terminálním zakončení ještě pomocný řetězec o 2 až 50 aminokyselinách, přičemž relativní hydrofobnost těchto pomocných řetězců, vypočtené jako součet uvedené relativní hydrofobnosti v tabulce 1 pro jednotlivé aminokyseliny má zápornou hodnotu.

Pod pojmem "relativní hydrofobnost" se ve smyslu vynálezu rozumí údaje, tak jak byly vysvětleny v publikacích T. E. Creighton (1983), *Proteins, Structure and Molecular Principles*, W. H. Freeman a Company, New York, str. 142, tabulka 4,4, G. von Heijne a C. Blomberg (1979), *Eur. J. Biochem.* 95, 175 - 181 a Y. Nozaki a C. Tanford (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 2211 - 2217. Stanovení hodnot pro relativní hydrofobnost aminokyseliny se provádí například podle Nozakiho a Tanforda zjištění rovnovážného stavu při dělení těchto aminokyselin mezi nepolární rozpouštědlo, například směs ethanolu a dioxanu a mezi vodu. Relativní hydrofobnost je hodnota pro energii a uvádí se v kcal/mol. Kladná hodnota pro relativní hydrofobnost znamená, že se látka přednostně rozpouští v nepolárních rozpouštědlech, což znamená, že jde o nepolární aminokyselinu. V případě, že relativní hydrofobnost má hodnotu, která je nižší než 0, jde o polární aminokyselinu, která se přednostně rozpouští ve vodě při srovnání s nepolárními rozpouštědly. V případě takových aminokyselin se při přechodu například z ethanolu do vody uvolní energie.

V následující tabulce jsou shrnuty hodnoty pro relativní hydrofobnost jednotlivých aminokyselin.

T a b u l k a 1

aminokyselina	relativní hydrofobnost (kcal/mol)
Gly	0
Leu	1,8
Ile	2,5
Val	1,5
Ala	0,5
Phe	2,5
Cys	-2,8
Met	1,3
Thr	0,4
Ser	-0,3
Trp	3,4
Tyr	2,3
Gln	-0,3
Lys	-4,2
Asn	-0,2
Glu	-9,9
His	0,5
Asp	-7,4
Arg	-11,2
Pro	-3,3

Z tabulky je zřejmé, že aminokyseliny cystein, prolin a zvláště glutamát, aspartát, arginin a lysin jsou silně negativně relativně hydrofobní.

Neočekávaně bylo zjištěno, že připojením pomocného řetězce s délkou 2 až 50 aminokyselin k řetězci bílkoviny je možno podstatně zlepšit aktivaci rekombinantní bílkoviny v případě, že tento pomocný řetězec má ve svém součtu negativní hodnotu pro relativní hydrofobnost. Výhodná délka pomocného řetězce je 2 až 20 a zvláště 5 až 20 aminokyselin.

Dále je výhodné, aby pro tyto pomocné řetězce měl kvocient relativní hydrofobnosti a počtu aminokyselin hodnotu  $-2,0$  kcal/mol nebo nižší, zvláště  $-2,5$  kcal/mol nebo nižší, nejvýhodnější hodnota je  $-2,8$  kcal/mol nebo nižší.

Navázání pomocného řetězce na rekombinantní bílkovinu je možno uskutečnit postupem, běžným v oboru molekulární biologie. Postupuje se s výhodou tak, že se na jedno nebo na obě zakončení kódového řetězce DNA pro rekombinantní bílkovinu, k jejíž expresi má dojít naváže oligonukleotidový řetězec, který je kódem pro svrchu popsany pomocný řetězec s gelkovou zápornou hodnotou pro relativní hydrofobnost. K tomuto účelu se například z genu, k jehož expresi má dojít izolují fragmenty DNA, které obsahují oblast, která je kódem pro začátek nebo pro konec odpovídajícího genu. Do těchto fragmentů DNA je pak možno například při použití jiných míst štěpení restrikními enzymy přidat syntetické oligonukleotidy, obsahující kódovou oblast pro pomocné řetězce. Další možnost spočívá v tom, nahradit přírodní fragmenty DNA v genu úplně oligonukleotidovými řetězci. Tímto způsobem je možno získat modifikované řetězce DNA, které kromě nutné informace pro rekombinantní bílkoviny obsahují ještě informaci pro přídatné pomocné řetězce.

---

Jako řetězce DNA, které jsou kódem pro pomocné řetězce na N-terminálním zakončení, se s výhodou užijí takové řetězce DNA, jejichž kodony jsou upraveny tak, aby odpovídaly kodonům, obvyklým v organismu, v němž má dojít k expresi, jak bylo vysvětleno v publikaci E. L. Winnacker, *Gene und Klone*, Verlag Chemie, 1985, 224 - 241.

Pro *Escherichia coli* jako organismus, v němž má dojít k expresi, se z tohoto důvodu pro následující aminokyseliny s výhodou užijí uvedené kodony:

Threonin	ACA
Prolin	CCA
Leucin	CTA
Lysin	AAA
Alanin	GCC
kyselina glutamová	GAA.

DNA, modifikovaná způsobem, který je kódem pro rekombinantní bílkovinu s připojeným pomocným řetězcem se uloží pomocí transformace do produkční buňky, s výhodou do prokaryotické buňky a zvláště do buňky *E. coli*. Pak se takto transformované buňky pěstují ve vhodném prostředí, získané buňky se rozruší a rekombinantní bílkovina v alespoň částečně inaktivním stavu se izoluje, obvykle se taková bílkovina nachází v buňce ve formě inkluzních tělísek. Nakonec se provede solubilizace a renaturace takové bílkoviny, s výhodou při pH, při němž může bílkovina zaujmout nativní formu. Tyto stupně je možno provádět pomocí známých postupů, tak jak byly uvedeny například ve svrchu uvedených publikacích při popisu známého stavu techniky. Aktivace bílkoviny se provádí s výhodou například renaturací pomocí pulsů, tak jak byl tento postup popsán například v evropském patentovém spisu č. 241 022. Zlepšení, kterého je možno dosáhnout způsobem podle vynálezu oproti známým postupům spočívá zejména v přítomnosti pomocných řetězců, předběžně navázaných na N- a/nebo C-terminální zakončení rekombinantní bílkoviny. Pomocné řetězce se s výhodou připojují na N-terminální zakončení bílkoviny, která má být aktivována. Navázání pomocného řetězce na C-terminální zakončení však také vede k pozitivním výsledkům.

Z pomocných řetězců jsou výhodné takové řetězce, které obsahují alespoň dvě aminokyseliny ze skupiny glutamát, aspartát, lysin, arginin a prolin, přičemž lysinové a glutamátové zbytky jsou zvláště výhodné a nejvýhodnější je glutamátový zbytek. Dále je zvláště výhodné použít pomocný řetězec,

v němž po sobě následují dva ze svrchu uvedených zbytků aminokyselin, to znamená zbytek glutamátu, aspartátu, lysinu a argininu s obdobným nábojem, s výhodou v řetězci po sobě následují dva zbytky lysinu nebo glutamátové zbytky, nejvýhodnější je použít dvou po sobě následujících glutamátových zbytků.

Pro pozdější léčebné použití rekombinantních bílkovin, získaných způsobem podle vynálezu je výhodné, aby se místo štěpení nacházelo na přechodu mezi pomocným řetězcem a požadovanou bílkovinou. V případě, že se postupuje tímto způsobem, je možno získat přírodní řetězec aminokyselin požadované bílkoviny. Místem štěpení může být řetězec, rozpoznávaný proteázou nebo chemickým reakčním činidlem pro štěpení bílkovin, například bromkyanem, nejvýhodnější je místo štěpení pro proteázu. Zvláště výhodné je použít místo štěpení pro IgA-proteázu, tak jak to bylo popsáno ve WO 91/11520. Přesné podmínky štěpení jsou v uvedeném spisu rovněž popsány. Dále je výhodné také použití štěpného místa, které je štěpným místem pro faktor Xa.

Takové štěpné místo v řetězci bílkovin není při použití rekombinantní bílkoviny pro analytické účely nezbytné.

Dále konkrétní příklady pomocných řetězců, které jsou vhodné pro zlepšení aktivace uvedených bílkovin budou dále uvedeny pro N-terminální zakončení takové bílkoviny.

Met-Glu (řetězec 1)

Met-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 2)

Met-Thr-Pro-Leu-His-His-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 3)

Met-Thr-Pro-Leu-Lys-Lys-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 4)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 5)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gly-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 6)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gln-Pro-Pro (řetězec 7)

Met-Lys-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-His-Pro-Arg-Pro-Pro  
(řetězec 8)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg (řetězec 9)

Met-Thr-Pro-Leu-Lys-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-His-Pro-Arg-Pro-Pro  
(řetězec 10).

Pomocné řetězce 5, 6, 7 a 9, které obsahují dva po sobě následující glutamátové zbytky, poskytují nejvyšší výtěžky při renaturaci bílkoviny a jsou proto nejvýhodnější.

Způsob podle vynálezu je vhodný zejména pro použití k aktivaci rekombinantních bílkovin lidského původu a jejich derivátů, které byly vyprodukovány v prokaryotických organismech, může jít například o aktivátory plasminogenu, interferony, interleukiny a o faktory, stimulující tvorbu kolonií granulocytů. Zvláště výhodný je postup, při němž je bílkovinou, která má být aktivována faktor, stimulující tvorbu kolonií granulocytů G-CSF, který obsahuje na začátku řetězce své DNA řetězec ACACCA. Stejně výhodné jsou také deriváty G-CSF, které jsou uvedeny v evropském patentovém spisu č. 456 200.

Vektor pKK177-3-G-CSF 8g byl uložen 28. března 1990 do veřejné sbírky Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Grisebachstr. 8, D-3400 Göttingen pod číslem DSM 5867.

Vynález bude dále osvětlen v souvislosti s příloženými výkresy.

#### Popis výkresů

Na obr. 1 je znázorněna závislost koncentrace při renaturaci (koncentrace argininu 0,2 mol/l) pro konstrukce, jejichž řetězec je analogický řetězci 0 z tabulky 2 (křivka 1), řetězci 3 (křivka 2), řetězci 5 (křivka 3) a řetězci 8 (křivka 4).

Na obr. 2 je znázorněna závislost koncentrace při renaturaci (koncentrace argininu 0,8 mol/l) pro konstrukce, které obsahují řetězce, analogické řetězci 0 z tabulky 2 (křivka 1), řetězci 3 (křivka 2), řetězci 5 (křivka 3) a řetězci 8 (křivka 4).

Na obr. 3 je znázorněna závislost výtěžku renaturace na koncentraci argininu, označení křivek je stejné jako na obr. 1 a 2.

Na obr. 4 jsou znázorněny výtěžky reaktivace v závislosti na době inkubace (koncentrace argininu 0,2 mol/l, označení křivek je stejné jako na obr. 1 a 2).

Praktické provedení způsobu podle vynálezu bude osvětleno následujícími příklady.

#### Příklad 1

##### Konstrukce vektorů

Vektor pKK177-3 G-CSF Bg, DSM 5867 se rozštěpí parciálně enzymem EcoRI a enzymem ApaI a do vzniklého linearizovaného fragmentu vektoru o velikosti přibližně 3450 párů bazí se uloží oligonukleotid

EcoRI		ApaI
AATTCGGAGGAAAAATTA	ATG .....	ACACCACTGGGCC
	Met .....	G-CSF-řetězec bez ATG

AATTCGGAGGAAAAATTA: řetězec 11

ACACCACTGGGCC: řetězec 12.

Vložený řetězec DNA odpovídá genetickému kódu pro aminokyseliny, uvedené v tabulce 2, to znamená například pro konstrukci 3 se užije oligonukleotid s genetickým kódem pro řetězec Met-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 3). Plasmid, který vzniká navázáním oligonukleotidu do rozštěpeného vektoru se užije k transformaci *E. coli* HB101. Aby bylo možno dosáhnout lepší regulovatelnosti *tac*-promotoru, transformují se buňky navíc pomocí plasmidu pBP010, který se získá podle evropské patentové přihlášky č. 91 111 155.7, jde o kompatibilní plasmid, který obsahuje gen *lacI<sup>q</sup>*. Tento gen je v oboru již dlouho znám a je možno jej snadno získat. Jako kompatibilní plasmidy k plasmidu pBP010 je možno užít plasmid pACYC 177, DSM 3693P, v němž je uložen gen *lacI<sup>q</sup>* nebo od něj odvozené plasmidy, tak jak byly popsány v publikaci *Gene* 85, 1989, 109 - 114 a v evropském patentovém spisu č. 373 365. Výsledné klony se podrobí selekci na prostředí, které obsahuje 50 mikrogramů/ml kanamycinu a 50 mikrogramů/ml ampicilinu, identifikace se provádí pomocí analýzy restričními enzymy. Při rozštěpení enzymy *EcoRI* a *RcORV* se získají fragmenty o délce 3,15 kb, přibližně 0,3 kb v závislosti na jednotlivých konstrukcích a 4,85 kb.

## Příklad 2

### a) Fermentace

Klony, které byly podle příkladu 1 identifikovány jako pozitivní se inkubují v 5 ml prostředí LB s kanamycinem a ampicilinem, jak bylo uvedeno v příkladu 1, až do hustoty  $OD_{550}$  0,5, pak se provádí indukce při použití IPTG v koncentraci 5 mmol/l, načež se klony inkubují ještě 3 hodiny při teplotě 37 °C. 10  $OD$  takto indukované kultury se odebere a připraví se extrakt celých buněk. Tento extrakt se podrobí analýze na gelu SDS-Page.

V případě, že se prokáže, že došlo k expresi požadovaného produktu, opakuje se kultura v měřítku 1 litr a ze všech buněk se připraví preparát, obsahující inkluzní tělíška IB.

#### b) Příprava IB

Buňky se oddělí odstředěním, uvedou se do suspenze ve 100 ml tris-pufry s obsahem hořčíku, který obsahuje 10 mmol/l tris o pH 8,0 s obsahem 1 mmol/l chloridu hořečnatého a pak se buňky rozruší přidáním lysozymu 0,3 mg/ml.

Směs se inkubuje 15 minut při teplotě 37 °C a pak se užije tlaku 8,4 MPa. Pak se materiál štěpí přidáním 2 mg DNA-ázy I 30 minut při teplotě 37 °C.

Pak se přidá 20 ml chloridu sodného 0,5 mol/l, s obsahem 20 mmol/l EDTA o pH 8,0 a 3 ml 20% Triton X 100 a směs se inkubuje 10 minut při teplotě místnosti.

Pak se suspenze odstředí 10 minut při 15000 ot/min a teplotě 4 °C. Usazenina se uvede do suspenze ve 30 ml 50 mmol/l Tris o pH 8,0 s obsahem 50 mmol/l EDTA a 0,5 % Triton X 100 a suspenze se zpracuje působením ultrazvuku. Pak se suspenze odstředí, materiál se znovu uvede do suspenze a znovu zpracuje ultrazvukem. Tento postup se ještě dvakrát opakuje. Nakonec se materiál odstředí a získaná usazenina se užije jako inkluzní tělíška v příkladu 3.

#### Příklad 3

#### Solubilizace/renaturace

a) Solubilizace

Solubilizační pufr:

6 mol/l guanidinhydrochloridu,  
0,1 mol/l tris-pufu o pH 8,0,  
1 mmol/l EDTA,  
100 mmol/l DTE (dithioerythritol).

Dialyzační pufr 1:

6 mol/l guanidinhydrochloridu,  
3 mmol/l EDTA o pH 3,0.

1 g inkluzních tělísek se přidá ke 30 ml solubilizačního pufru, směs se 5 minut homogenizuje pomocí ultrazvuku a pak se 1 hodinu inkubuje při teplotě místnosti. Přidá se kyselina chlorovodíková do pH 3,0. Pak se nerozpustný materiál oddělí odstředěním.

Výsledný materiál se pak dialyzuje proti dialyzačnímu pufru 1 tak dlouho, až se DTE odstraní na hodnotu 1 mmol/l nebo nižší.

b) Reaktivace pomocí pulsů

Renaturační pufr:

0,8 mol/l argininhydrochloridu,  
0,1 mol/l tris-pufu o pH 8,0,  
0,5 mmol/l GSH,  
0,5 mmol/l GSSG,  
1 mmol/l EDTA.

## Dialyzační pufr 2

10 mmol/l tris-pufu o pH 8,0,  
1 mmol/l EDTA.

Reaktivace pomocí pulsů se provádí způsobem podle evropského patentového spisu č. 241 022. Užije se zařízení, které je znázorněno na obr. 5 uvedeného evropského patentového spisu.

Bílkovina se přidává v intervalech 30 minut do reakčního objemu 100 ml renaturačního pufru tak, aby se koncentrace bílkoviny v reakčním objemu v jednom pulsu zvýšila o 50 mikrogramů/ml. Celkem se provede 20 pulsů, konečná koncentrace je 1 mg/ml reakčního objemu.

Po reaktivaci se z reakční směsi odstraní zákal odstředěním a materiál se dialyzuje proti dialyzačnímu pufru 2 až do snížení obsahu argininu na hodnotu 50 mmol/l nebo nižší. Zkoušky se provádějí s výhodou měřením vodivosti materiálu. Dialýzu je možno ukončit, jakmile je vodivost dialyzačního pufru a reakční směsi stejná. Výtěžek reaktivace pro jednotlivé konstrukce, stanovený testem na účinnosti je uveden v následující tabulce 2.

Tabulka 2

	% renatu- race 2	relativní hydrofobnost (kcal/mol)	rel. hydrofobnost hodnoty pro aminokyseliny
(0) Met-G-CSF <sup>1</sup>	10	1,3	1,3
(1) Met-Glu-G-CSF	50	- 8,6	- 4,3
(2) Met-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-G-CSF	20	- 20,9	- 2,6
(3) Met-Thr-Pro-Leu-His-Pro-Arg-Pro-G-CSF	20	- 19,9	- 2
(4) Met-Thr-Pro-Leu-Lys-Lys-Pro-Arg-Pro-G-CSF	50	- 29,3	- 2,9
(5) Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Gly-Pro-Arg-Pro-G-CSF	80-90	- 40,7	- 3,7
(6) Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Gly-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-G-CSF	80	- 41,8	- 2,9
(7) Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Gln-Pro-G-CSF	80	- 26,5	- 2,9
(8) Met-Lys-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-His-Pro-Arg-Pro-G-CSF	60	- 44,3	- 3,4
(9) Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg-G-CSF	80	- 38,1	- 3,5
(10) Met-Thr-Pro-Leu-Lys-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-His-Pro-Arg-Pro-Pro-G-CSF	50	- 45,4	- 2,8

1 srovnávací látka

2 stanoveno zkouškou na účinnost G-CSF podle příkladu 3

řetězce 1 - 10 jsou vázány na řetězec G-CSF bez N-terminálního methioninového zbytku.

#### Příklad 4

#### Stanovení účinnosti G-CSF

Účinnost G-CSF se stanoví při použití buněčné linie myší leukemie NFS60, která je úplně závislá na přítomnosti G-CSF, jak bylo popsáno v publikacích Biochem. J. 253, 1988, 213 - 218, Exp. Hematol. 17, 1989, 116 - 119 a Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1986, 5010. Aby bylo možno udržet závislost buněk na uvedeném faktoru, obsahuje živné prostředí pro udržovací kulturu stále 1000 jednotek/ml G-CSF. Užívá se prostředí RPMI s 10 % fetální telecího sera (Boehringer Mannheim GmbH, objednací číslo 2099445).

Při tomto testu se přímo měří proliferace buněk NFS60 působením G-CSF vestavbou  $^3\text{H}$ -thymidinu. Zkouška se provádí následujícím způsobem:

Buňky NFS60, které se nacházejí v exponenciální fázi růstu (mnžství buněk maximálně  $1 \times 10^5$  buněk/ml) se přenesou na mikrotitrační plotny ( $1 \times 10^4$  buněk/vyhloubení) a pěstování se provádí při klesající koncentraci G-CSF. Maximální dávka G-CSF ve vyhloubení 1 odpovídá koncentraci v udržovací kultuře 1000 jednotek/ml, specifická účinnost  $1 \times 10^8$  jednotek/mg bílkoviny. Ředění se provádí vždy po desetinásobcích.

Po přibližně 24 hodinách inkubace se přidá  $^3\text{H}$ -thymidin (0,1  $\mu\text{Ci}$ /vyhloubení). Pak se buňky inkubují ještě dalších 16 hodin.

Pro vyhodnocení zkoušek se buňky namrazí na mikrotitrační plotně tak, že dojde k jejich rozrušení. Materiál se odsaje na skleněný filtr, promyje, suší a filtry se měří při použití scintilačního počítače. Vestavba  $^3\text{H}$ -thymidinu je přímo úměrná proliferaci buněk NFS60, indukované G-CSF.

## Příklad 5

Stanovení výtěžku renaturace v závislosti na koncentraci denaturované bílkoviny při jednorázovém přidání

Výchozí materiál: inkusní tělíška s obsahem konstrukcí č. 0, 3, 5 a 8 z tabulky 2.

Solubilizace a první dialýza:

Materiál inkusních tělíšek I8 se solubilizuje analogickým způsobem jako v příkladu 3, dialyzuje se k odstranění redukčního činidla a pak se koncentrace bílkovin upraví na 30 mg/ml (M,M, Bradford, Anal. Biochem. 72, 1976; 255).

Renaturace:

Reaktivace se provádí v 0,8 mol/l nebo 0,2 mol/l argininhydrochloridu s 10 mmol/l EDTA, 0,5 mmol/l GSH a 0,5 mmol/l GSSG při teplotě 20 °C a pH 8,0.

V renaturační směsi se koncentrace bílkoviny nastaví na rozmezí 0,3 až 3 mg/ml. Koncentrace guanidinhydrochloridu je ve všech vzorcích 0,55 mol/l.

Po inkubaci 3 hodiny při teplotě místnosti se reakce zastaví okyselením na pH 4,5.

Poměr denaturované a renaturované bílkoviny se stanoví při použití HPLC.

Rozpouštědlo A: 0,12 % objemových kyseliny trifluoroctové,  
rozpouštědlo B: 90 % objemových acetonitrilu, 0,1 % objemových kyseliny trifluoroctové.

Gradient B: 40 až 70 % v průběhu 30 minut.

Průtok: 1 ml/min, detekce při 280 nm.

Výsledky uvedených zkoušek jsou graficky znázorněny na obr. 1 a 2.

#### Příklad 6

Renaturace v závislosti na koncentraci argininu

Výchozím materiálem pro tuto zkoušku byly dialyzované vzorky po solubilizaci, koncentrace bílkoviny 10 mg/ml, byly užity konstrukce 0, 3, 5 a 8 z tabulky 2, získané způsobem podle příkladu 5.

Jednorázovým přidáním denaturované bílkoviny byla koncentrace bílkoviny v renaturačním pufru nastavena na 1 mg/ml. Renaturační pufr obsahoval 0 až 0,8 mol/l argininhydrochloridu, 100 mmol/l tris, 10 mmol/l EDTA, 0,5 mmol/l GSH a 0,5 mmol/l GSSG, teplota místnosti, pH 8.

Po inkubační době 3 hodiny byla reakce zastavena okyselením na pH 4,5. Následující vyhodnocení bylo prováděno pomocí HPLC stejně jako v příkladu 5.

Výsledky uvedených zkoušek jsou graficky znázorněny na obr. 3.

---

#### Příklad 7

Kinetika reaktivace bílkoviny v pufru, obsahujícím 0,2 mol/l argininu

Výchozí materiál: jako výchozí materiál byly užity solubilizáty, získané způsobem podle příkladu 6.

Reaktivace byla prováděna při teplotě místnosti a při pH 8 v pufru, který obsahoval 0,2 mol/l argininhydrochloridu,

10 mmol/l tris, 10 mmol/l EDTA, 0,5 mmol/l GSH a 0,5 mmol/l GSSG. Koncentrace bílkoviny v reakčním vzorku byla upravována vždy jednorázovým přidáním na obsah bílkoviny 1 mg/ml, koncentrace guanidinu byla ve vzorku upravována na množství této látky 0,55 mol/l. Po 5, 10, 15, 60 a 180 minutách byly odebírány vzorky reakční směsi, reakce byla vždy zastavena okyselením reakční směsi na pH 4,5 a výsledek i kinetika reaktivace byly stanoveny HPLC obdobným způsobem jako v příkladu 5.

Výtěžek reaktivace v závislosti na inkubační době je graficky znázorněn na obr. 4.

Dále budou formou tabulky uvedeny podrobnější údaje o jednotlivých použitých řetězcích.

Použité řetězce

Počet řetězců 12

Řetězec 1

(i) charakteristika řetězce:

- A) délka: dvě aminokyseliny
- B) typ: řetězec aminokyselin
- D) druh řetězce: lineární.

(xi) Popis řetězce:

Met-Glu

1

Řetězec 2

(i) charakteristika řetězce:

- A) délka: osm aminokyselin
- B) typ: řetězec aminokyselin
- D) druh řetězce: lineární.

(xi) popis řetězce:

Met-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Pdo

1

5

Řetězec 3

(i) charakteristika řetězce:

- A) délka: 10 aminokyselin
- B) typ: řetězec aminokyselin
- D) druh řetězce: lineární.

(xi) Popis řetězce:

Met-Thr-Pro-Leu-His-His-Pro-Arg-Pro-Pro

1

5

10





Řetězec 11:

(i) charakteristika řetězce:

- A) délka: 18 párů bazí
- B) typ: řetězec nukleových kyselin
- C) řetězec: jednoduchý
- D) druh řetězce: lineární.

(xi) popis řetězce:

AATTCGGAGG AAAAATTA

18

Řetězec 12

(i) charakteristika řetězce:

- (i) A) délka: 13 párů bazí
- B) typ: řetězec nukleových kyselin
- C) řetězec: jednoduchý
- D) druh řetězce: lineární.

(xi) popis řetězce:

ACACCACTGG GCC

13

Zastupuje:

  
JUDr. Zdenka KOFEJZOVÁ  
advokátka

009574
20. 11. 92
ÚŘAD ROVNÁLEZY A OBJEVY
Č. j.

1. Způsob aktivace rekombinantních bílkovin, nacházejících se alespoň z části v neaktivní formě, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aktivuje solubilizačním a/nebo renaturačním způsobem bílkoviny, která obsahuje ve svém N- a/nebo C-terminálním zakončení ještě pomocný řetězec o 2 až 50 aminokyselinách, přičemž relativní hydrofobnost těchto pomocných řetězců, vypočtená jako součet uvedené relativní hydrofobnosti v tabulce 1 pro jednotlivé aminokyseliny, má zápornou hodnotu.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocný řetězec má hodnotu relativní hydrofobnosti vzhledem k počtu aminokyselin  $-2,0$  kcal/mol nebo nižší.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocný řetězec má hodnotu poměru relativní hydrofobnosti vzhledem k počtu aminokyselin  $-25$  kcal/mol nebo nižší.

4. Způsob podle nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocné řetězce jsou navázány na N-terminální zakončení bílkoviny, která má být aktivována.

5. Způsob podle nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocné řetězce jsou navázány na C-terminální zakončení bílkoviny, která má být aktivována.

6. Způsob podle nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocné řetězce obsahují alespoň dvě aminokyseliny, zvolené ze skupiny zbytku glukamátu, aspartátu, lysinu, argininu a prolinu.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocné řetězce obsahují alespoň dva glutamátové zbytky.

8. Způsob podle nároku 6 nebo 7 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocné řetězce obsahují dva bezprostředně po sobě následující aminokyseliny stejného náboje ze skupiny, zahrnující zbytek glutamátu, aspartátu, lysinu a argininu.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pomocné řetězce obsahují dva bezprostředně po sobě následující glutamátové zbytky.

10. Způsob podle nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aktivují bílkoviny, obsahující štěpné místo na přechodu mezi pomocným řetězcem a požadovanou výslednou bílkovinou.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že aktivovaná bílkovina obsahuje štěpné místo, rozpoznávané proteázou.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že aktivovaná bílkovina obsahuje štěpné místo, které je rozpoznáváno IgA-proteázou.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že štěpným místem je místo štěpení faktorem Xa.

14. Způsob podle nároků 1 až 13 , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aktivuje bílkovina, obsahující na svém N-terminálním zakončení některý z následujících pomocných řetězců,

Met-Glu (řetězec 1)

Met-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 2)

Met-Thr-Pro-Leu-His-His-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 3)

Met-Thr-Pro-Leu-Lys-Lys-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 4)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gly-Pro-Arg-Pro-Pro (řetězec 5)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gly-Thr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Pro  
(řetězec 6)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gln-Pro-Pro (řetězec 7)

Met-Lys-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-His-Pro-Arg-Pro-Pro  
(řetězec 8)

Met-Thr-Pro-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg (řetězec 9)

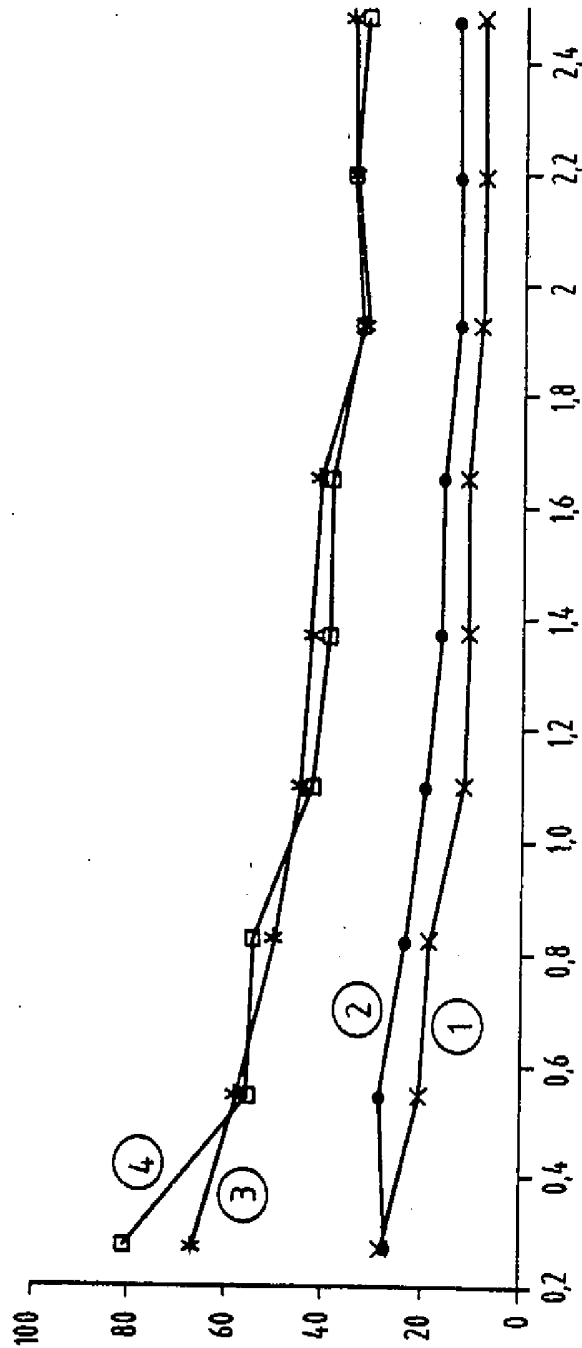
Met-Thr-Pro-Leu-Lys-Ala-Lys-Arg-Phe-Lys-Lys-His-Pro-Arg-Pro-Pro  
(řetězec 10).

15. Způsob podle nároků 1 až 14, v y z n a č u j í c í  
s e t í m , že se aktivuje bílkovina, která je faktorem,  
stimulujícím tvorbu kolonií granulocytů G-CSF nebo derivát  
této bílkoviny.

Zastupuje:

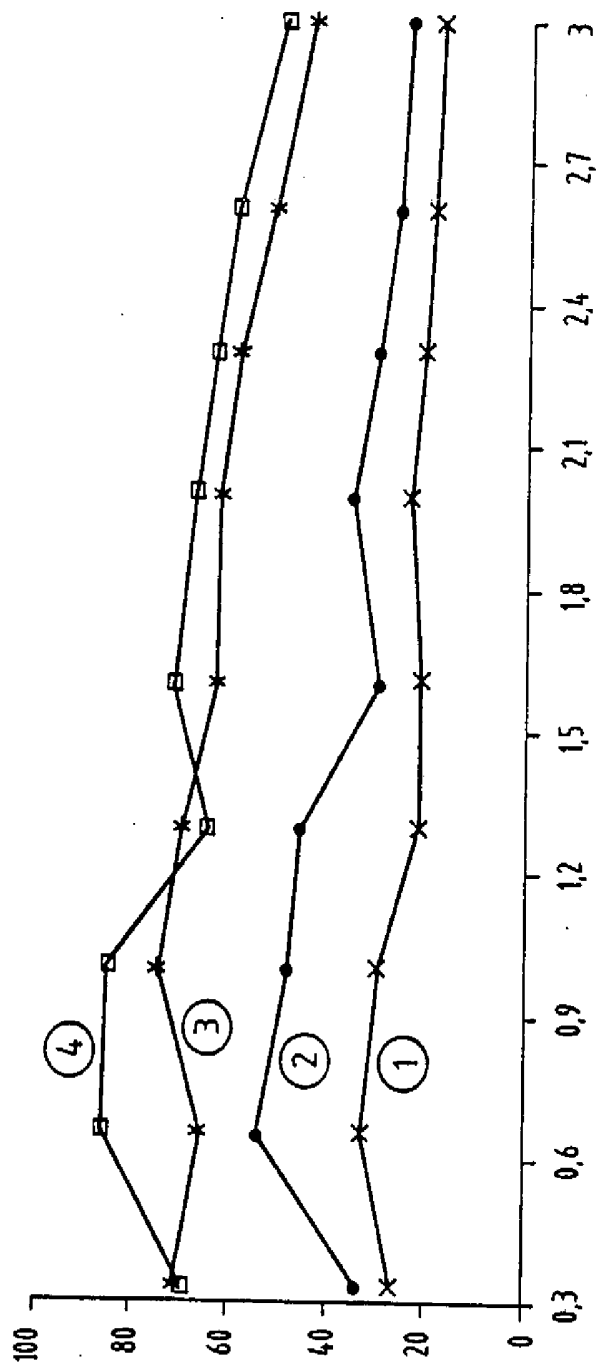
JUDr. Zdeňka KOREJČOVÁ  
advokátka

OBR.1



ÚRAD  
 PRŮVĚRNÉHO  
 A OBĚVY  
 PŘÍL.  
 009574  
 20.11.92  
 20.11.92

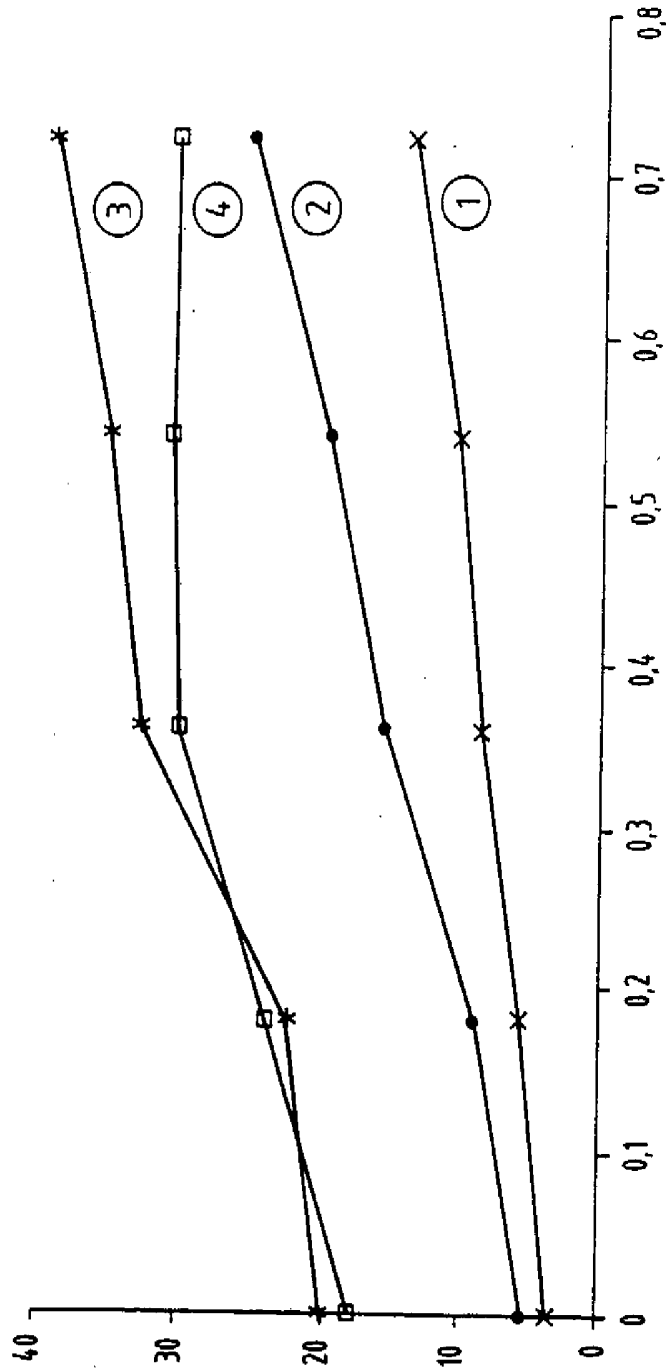
OBR.2



009574  
20.11.92  
URAD  
PRO VYNALEZY  
PRIL

JUDr. Zdeňka KOREJZOVÁ  
advokátka

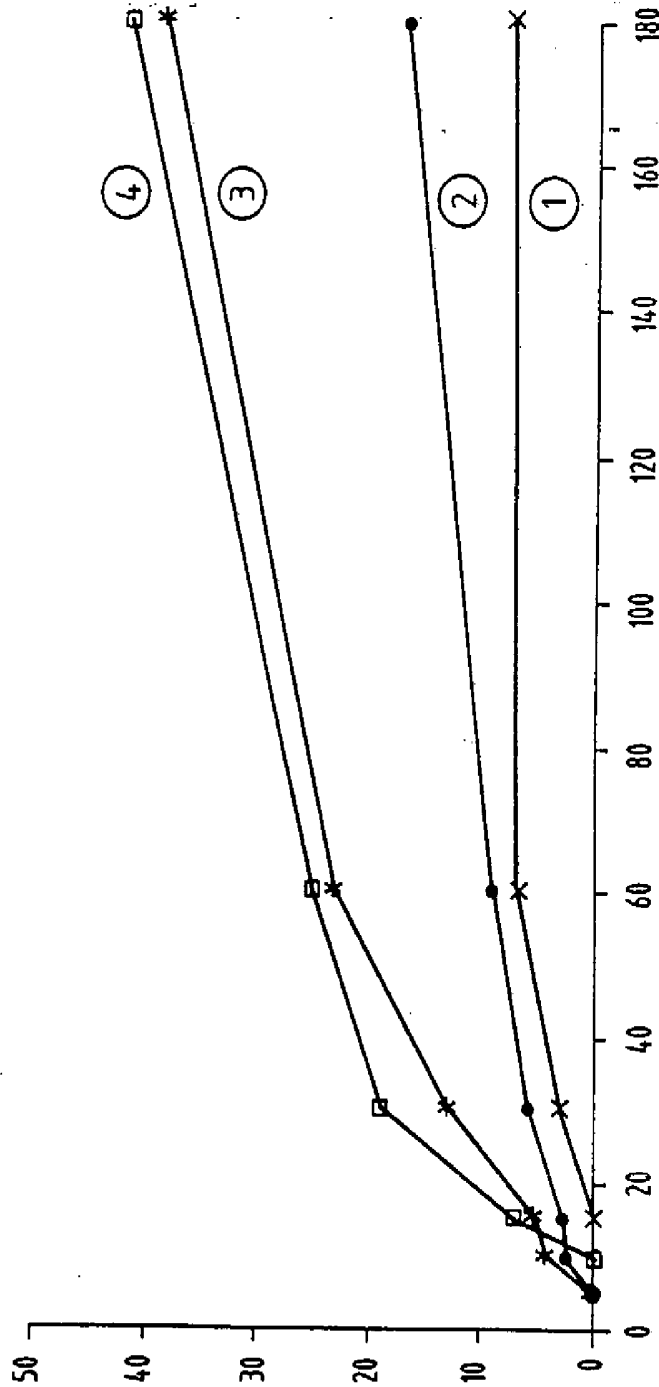
OBR.3



009574  
20.11.92  
ÚRAD  
PRO VYNALEZY  
PRIL.

JUDr. Zdeňka KOREJZOVÁ  
advokátka

# OBR.4



ÚRAD  
 PRO VYNALEZY  
 A OBJEVY  
 PRIL.

009574  
 20.11.92  
 1992