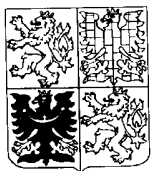


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 19.02.1999

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 23.02.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/075587

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.09.2001
(Věstník č. 9/2001)

(86) PCT číslo: PCT/US99/03271

(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/42486

(21) Číslo dokumentu:

2000 -3058

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/78

C 12 P 21/02

(71) Přihlašovatel:

G. D. SEARLE & CO., Skokie, IL, US;

(72) Původce:

Harding Elizabeth I., Kirkwood, MO, US;

Violand Bernard N., Glencoe, MO, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob výroby myšího a lidského endostatinu

(57) Anotace:

Způsoby výroby myšího a lidského endostatinu. Dále jsou popsány způsoby změny konformace svinutí endostatinu a čištění endostatinu z inkluzních těles, exprimovaných v bakteriích a nukleových kyselin, enkódujících úplné a zkrácené formy endostatinu.

Způsob výroby myšího a lidského endostatinuOblast techniky

Jsou popsány způsoby výroby myšího a lidského endostatinu. Jsou též popsány způsoby změny konformace svinutí, způsoby čištění endostatinu z inkluzních těles exprimovaných v bakteriích, a nukleové kyseliny, kódující formy endostatinu s úplným i zkráceným řetězcem.

Dosavadní stav techniky

Angiogenéze

Angiogenéze, t.j. růst nových krevních cest, hraje významnou roli při růstu rakoviny a metastáz. U lidí bylo prokázáno, že rozsah vaskulatury v nádoru koreluje u mnoha typů rakovin s prognózou pacienta (Folkman, J., Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston 333(26): 1757-1763, 1995; Gasparini, G., European Journal of Cancer 32A(14): 2485-2493, 1996; Pluda, J. M., Seminars in Oncology 24(2): 203-218, 1997; Norrby, K., APMIS 105: 417-437, 1997). U normálních dospělých je angiogenéze omezena na dobře řízené situace, jakými jsou například hojení poranění a ženský reprodukční systém (Bastetay, E.J., J Mol Med 73:333-346, 1995; Dvorak, H.F., New Engl J Med, 315: 1650-1659, 1988).

Pokusy na zvířatech naznačují, že nádory mohou existovat v latentním "spícím" stavu, ve kterém je růst nádoru omezen rovnováhou mezi vysokou rychlostí proliferace a vysokou rychlostí apoptosy (Holmgren, L. et al., Nat. Med. (N.Y.) 1(2): 149-153, 1995; Hanahan, D. et al., Cell 86(3): 353-364, 1996). Přepnutí z latentního na angiogenní fenotyp umožňuje

nádorovým buňkám uniknout ze stavu latentního a začít rychle růst, což je patrně důsledek snížení rychlosti odumírání (apoptosy) nádorových buněk (Bouck, Cancer Buňky, 2(6): 179-185, 1990; Dameron et al, Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 59: 483-489, 1994). Kontrola angiogenéze je podle dosavadních představ daná rovnováhou mezi faktory, které urychlují tvorbu nových součástí krevního řečiště a antiangiogenních faktorů, které omezují vytváření neovaskulatury (Bouck, N. et al., Advances in Cancer Research 69: 135-173, 1996; O'Reilly et al., Cell 79(2): 315-328, 1994).

Byla nalezena řada proangiogenních faktorů, mezi kterými lze uvést základní a kyselé fibroblastové růstové faktory (bFGF a aFGF) a růstové faktory vaskulární permeability a vaskulární endotheliální růstový faktor (VPF/VEGF) (Potgens, A. J. G. et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376: 57-70, 1995; Ferrara, N., European Journal of Cancer 32A(14): 2413-2442, 1996; Bikfalvi, A. et al., Endocrine Reviews 18: 26-45, 1997).

Bylo již také nalezeno několik endogenních antiangiogenních faktorů, mezi které patří angiostatin (O'Reilly et al., Cell 79(2): 315-328, 1994), endostatin (O'Reilly et al, Cell 88(2): 277-285, 1997), interferon-alfa, (Ezekowitz et al, N. Engl. J. Med., May 28, 326(22) 1456-1463, 1992), trombospondin (Good et al, Proc Natl Acad Sci USA 87(17): 6624-6628, 1990; Tolsma et al., J. Cell Biol. 122(2): 497-511, 1993), a faktor 4 krevních destiček (PF4) (Maione et al, Science 247(4938): 77-79, 1990).

Klinicky se vyvíjí mnoho angiogenních inhibitorů (Viz Shawver et al., Drug Discovery Today 2(2): 50-63, 1997, a tam uvedené odkazy). Polypeptidy jako je interferon alfa a faktor

4 krevních destiček jsou zkoušeny klinicky. Angiostatin, rozpustný Flt-1 receptor, a baktericidní proteinový derivát 23 zvyšující permeabilitu jsou v předklinickém stadiu testování. Monoklonální protilátky jako je humanizovaná anti- $\alpha_v\beta_3$ protilátka (LM609), anti-VEGF a anti-Flk-1 monoklonální protilátka (DC101) jsou také ve stadiu předklinických testů. Tecogalan (DS4152), sulfatovaný polysacharid-peptidoglykanový komplex je klinicky testován, a bFGF sacharidový inhibitor (GM1474) a glyceptor napodobující inhibitor bFGF (GL14.2) jsou ve stadiu předklinických zkoušek. Antibiotikum AGM1470 (TNP470), fumagilinový analog a Suramin, polyaniontová sloučenina, jsou klinicky testovány. Inhibitory s malou molekulou, jako jsou antagonisté urokinasového receptoru, inhibitory fosfatidové kyseliny, inhibitory Flk-1, a inhibitory vázacího VEGF-Fl1 jsou všechny ve stadiu předklinických testů. Thalidomid a jeho analogy, a matricové metaloproteinasové inhibitory, jako je Batimastat/Marimastat, jsou ve stadiu klinických testů. Oligonukleotidy, jako jsou ribozymy, zaměřené na VEGF receptory a VEGF anti-sense oligonukleotidy, jsou také ve stadiu před klinickými testy.

Antiangiogenní terapie může nabídnout oproti konvenční chemoterapii při léčení rakoviny několik výhod. Antiangiogenní činidla mají nízkou toxicitu při předklinických testech a dosud u nich nebyl pozorován vznik látkové resistance (Folkman, J., Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston 333(26): 1757-1763, 1995). Vzhledem k tomu, že angiogenéze je komplexní proces, který sestává z mnoha stupňů včetně invaze, proliferace a migrace endotheliálních buněk, lze předpokládat, že nejúčinnější by měla být kombinovaná terapie. Ve skutečnosti kombinace chemoterapie s antiangiogenní terapií se již prokázala slibné výsledky pro předklinické modely (Teicher, B. A. et

al., Breast Cancer Research a Treatment 36: 227-236, 1995; Teicher, B. A. et al., European Journal of Cancer 32A(14): 2461-2466, 1996).

Endostatin

Endostatin je protein o molekulové hmotnosti 20 kDa, odvozený od C-terminálního fragmentu alfa 1 typu kolagenu XVIII. Zjistilo se, že kultivační živná půda z upravené kultury buněk linie hemangioendotheliomu (EOMA) obsahuje faktor, který inhibuje endotheliální buněčnou proliferaci *in vitro* (O'Reilly et al., Cell 88: 277-285, 1997). Tento faktor, odpovědný za uvedenou inhibici, byl pojmenován endostatin. Rekombinační forma tohoto proteinu, exprimovaná v hmyzích buňkách infikovaných baculovirem inhiboval růst metastas u modelu Lewisova plicního tumoru a nerozpustná forma tohoto proteinu odvozená od *E. coli*, se u několika modelech nádorů ukázala být účinná pro prevenci růstu primárního nádoru (O'Reilly et al., Cell 88: 277-285, 1997; Boehm et al., Nature 380: 404-410, 1997).

Čištění a změna konformace svinutí endostatinu

Přestože bylo v posledních dvaceti létech vyvinuto mnoho typů exprimujících systémů, jsou v průmyslovém měřítku k výrobě proteinů široce užívány bakteriální systémy, zejména ty, které jsou založeny na *E. coli*. Vektory, které umožňují vysokou úroveň exprese a schopnost uskutečnit fermentace při vysokých hustotách buněk a při nízkých nákladech, přispěly k rychlému rozvoji a použití exprimujících systémů, založených na *E. coli*. Nicméně tendence získávat inkluzní tělesa, která obsahují žádaný rekombinační protein pomocí *E. coli*, je spojen s jedním závažným problémem. Vytváření

inklusního tělesa nutně vyžaduje další následný stupeň, který musí předcházet získání biologicky aktivních proteinů. Tímto stupněm je změna konformace svinutí řetězce *in vitro*. Tendence tvořit nerozpustné agregáty se nejeví jako korelující s faktory jako je velikost, hydrofobnost, struktura podjednotky nebo použití fusních domén (Kane J.F. a Harley, D.L., *Tibtech* 6: 95, 1988). Ukazuje se, že vytvoření inklusního tělesa je determinováno rychlostí syntézy proteinu, svinutí, agregace a proteolytická degradace, rozpustnost a termodynamika stáčení meziproductů a nativních proteinů a interakce těchto typů s chaperonovými proteiny (Rainer Rudolph, V *Protein Engineering: Principles a Practice*, Edited by Jeffrey L. Cleland a Charles S: Craik, p 283-298, Wiley-Liss, Inc., New York, New York, 1996).

Inkluzní tělesa se obecně tvoří v cytoplasmě buněk exprimujících ve vysokých hladinách rekombinační protein. Při pozorování fázovou kontrastní mikroskopií lámou světlo a tak jsou někdy označovány jako "refraktilní tělíska". Pro tato inklusní tělesa jsou charakteristické relativně vysoké specifické hustoty a lze je z buněčného lysátu oddělit odstředěním. Tvorba inkluzních těles může chránit rekombinační proteiny před proteolysou, jestliže se samy příliš snadno nerozkládají vlivem podmínek fyziologického roztoku. Vysoké koncentrace denaturátů, jako je 6 M guanidin hydrochlorid nebo 6-8 M močovina, již jsou všeobecně používány k solubilizaci proteinů, přítomných v inkluzních tělesech. Byla již srovnávána řada takovýchto solubilizačních postupů, pro solubilisaci inklusních těles (Fisher, B., Summer, L. a Goodenough, P. *Biotechnol. Bioeng.* 1: 3-13, 1992).

Přestože je požadovaný cizí genový produkt hlavní složkou inklusních těles, mohou být v takovýchto preparátech obohacené proteiny hostitelské buňky, jako například proteiny po malém tepelném šoku, proteiny vnější membrány, prodlužovací faktor EF-Tu a RNA polymeráza (Allen, S.P., Polazzi, J.O. Gierse, J.K., a Easton, A.M., J. Bacteriol. 174: 6938-6947, 1992); Hart, R.A., Rinas, U., a Bailey, J.E., J. Biol. Chem. 265: 12728-12733, 1990; Hartley, D.L., a Kane, J.F., Biochem. Soc. Trans. 16: 101, 1988).

Mezinárodní patentová přihláška WO 97/15666 popisuje expresi, čištění a charakterizaci endostatínu z *E. coli* a hmyzí buňky infikované baculovirem. Bacteriálně-odvozený endostatin nebyl upraven do nativního stavu změnou konformace stočení, ale byl použit jako nerozpustná suspence pro většinu z uvedených testů. V popisu tohoto vynálezu je také zahrnuto čištění nativního endostatínu od upraveného prostředí pro murin hemangioendotheliomovou buněčnou linii EOMA. Endostatin byl čištěn od tohoto upraveného prostředí pomocí klasické čistící metodiky.

Dosud nebyly popsány žádné úspěšné pokusy přeměnit konformaci svinutí endostatínu (O'Reilly et al., Cell 88: 277-285, 1997). Rekombinační endostatin odvozený od *E. coli*, charakterizovaný těmito autory, byl sražen a poté dialysován proti PHS. Sražený (nikoliv jinak svinutý) materiál nebylo možno testovat *in vitro*, protože nebyl rozpustný v kultivačním prostředí. Malé (nespecifikované) procento tohoto materiálu se v průběhu dialýzy spontánně rozpouštělo v PBS. Tento materiál měl srovnatelnou inhibiční účinnost v endotheliálních buňkách jako nativní a i jako rozpustný endostatin, odvozený od baculoviru. Poté co byl rekombinační endostatin, odvozený od *E. coli*, upraven změnou svinutí za

přítomnosti 0,1 M fosforečnanu sodného, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,6M močoviny, 2 mM redukovaného glutationu, 0,02 mM oxidovaného glutationu a 0,5 M argininu ve finální koncentraci 0,1 mg/ml, bylo přes 99% proteinu ztraceno. Tato velká ztráta vylučuje použití tohoto materiálu pro testy *in vivo*. Místo toho autoři použili pro většinu testů *in vivo* necharakterizovanou nerozpustnou formu endostatin (s nezměněným svinutím). Bylo pozorováno, že sraženina endostatinu, odvozeného od *E. coli*, se postupně v průběhu pěti dnů rozpouští a dosahuje se dlouhodobého antiangiogenního účinku při testech na chorioalantoidní membráně (CAM) kuřat. Suspense stejného materiálu tvořila v místě injekce u myši sraženinu, která pomalu zmizela v průběhu 24-48 hodin.

Následné testy pomocí stejné skupiny ukázala, že látková resistance se nevyvine, pokud jde o myš nesoucí karcinom plic, T241 fibrosarkom nebo B16F10 melanom, která je léčena myším endostatinem (Boehm, T., et al., Nature 590: 404407, 1997). Rekombinační murinový endostatin odvozený od *E. coli* byl připraven podle postupu uvedeného shora (O'Reilly et al., Cell 88: 277-285, 1997) s tím rozdílem, že bakterie byly vysráženy a resuspendovány v 8 M močovíně, 10 mM beta merkptoethanolu a 10 mM pH 8,0 a inkubovány po dobu 1 až 2 hodin. Beta merkptoethanol byl v následujících krocích odstraněn. Rekombinační myší endostatin byl myším podáván jako suspense v PBS. Myši nesoucí jeden ze tří uvedených typů nádorů byla podkožně dorsálně injekčně vstříknuta suspense čištěného, ale málo rozpustného endostatinu, a to do místa, vzdáleného od místa inokulace nádorů. Léčení bylo zastaveno poté, co došlo k regresi nádoru, a pak byl ponechán opět růst. Růst nádoru se neopakoval po 6, 4 nebo 2

endostatinových léčebných cyklech, čímž byla terapie ukončena.

V současné době byla izolována a charakterizována oběhová forma lidského endostatinu (Standker et al., FEBS Letters 420: 129-133, 1997). Peptidy s vysokou molekulovou hmotností (1-20 kDa) byly izolovány z 2 500 litrů ultrafiltrátu lidské krve (hemofiltrát, HF) získané od pacientů trpících chronickou nedostatečností ledvin. Extrakty byly spojeny na preparativní kationtoměnoičové koloně a eluovány pH stupňovou frakcionací (7 pufrů s pH rostoucím od 3,6 do 9,0). Peptidy s vysokou molekulovou hmotností pak byly detekovány ve stupni ("poolu") 8, který byl eluován vodou, a následně čištěn HPLC s reversní fází. Alikvotní díly byly podrobeny hmotnostní spektrometrii (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry) (MALDI-MS) a byla stanovena přesná molekulová hmotnost elektrorozprašovací hmotnostní spektroskopii (ES-MS), přičemž bylo nalezeno 18,494 Da. V molekule byla nalezena cysteinová residua 1-3 a 2-4, navázaná disulfidovými můstky. Finální výtěžek byl v průběhu čištění odhadnut na 20 %, což mělo za výsledek dosažení koncentrace $>10^{-11}$ M. v hemofiltrátu. Výsledná koncentrace endostatinu v pacientově plasmě byla odhadnuta v rozmezí 10^{-10} M nebo vyšší. Není známo, jestli existují tkáně, které by endostatin vázaly, vůbec existují, jak bylo navrženo pro angiostatin (Kost et al., Eur J. Biochem. 256: 682-688, 1996). *In vitro* biologická charakterizace nativního lidského endostatinu (který byl o 12 aminokyselin kratší než myší endostatin), nevykazuje žádnou antiproliferační aktivitu na různé typy endotheliálních buněk. Charakterizace rekombinačních forem lidského endostatinu nebyla hlášena. Autoři spekulují, že rozdíly v aktivitě myších a lidských forem endostatinu by mohly být důsledkem několika faktorů:

(i) tyto dvě formy se dají izolovat z různých zdrojů a mohou mít různou selektivitu, specifickou nebo účinnost při *in vitro* a *in vivo* testech.

(ii) Rozdíly v posttranslačních modifikacích, které byly mezi peptidy nalezeny, mohou také být příčinou neshody v uváděných aktivitách.

(iii) Lidský endostatin nemusí nutně inhibovat proliferaci endotheliálních buněk, ale nepřímo ovlivňovat jiné buněčné části, které jsou pozorovatelné pouze v úplném systému *in vivo*.

Podstata vynálezu

Prvním předmětem vynálezu je způsob exprimace vysokých kladin endostatinu v bakteriích. Dalším aspektem vynálezu je efektivní způsob, kterým se dají endostatinová inkluzní tělesa solubilizovat, poté upravit svinutí a čistit, za účelem získání biologicky aktivního materiálu.

Výhodně se kroky solubilizace inkluzních těles s obsahem myšího nebo lidského endostatinu provádějí při zvýšeném pH. Výhodně má zvýšené pH v solubilizačním kroku hodnotu v rozmezí od asi pH 9 do asi pH 11,5. Dokonce výhodněji výhodně je zvýšené pH od asi pH 10 do asi pH 11. Nejvýhodněji je zvýšené pH = 10,5.

Výhodně se kroky změny svinutí inkluzního tělesa myšího nebo lidského endostatinu provádějí při pH, které je blízké neutrálnímu. Výhodně je neutrální pH v solubilizačním kroku prováděno v rozmezí hodnot pH od asi pH 6 do asi pH 8,5. Ještě výhodněji je rozmezí pH, blízké neutrálnímu, pro změnu svinutí myšího endostatinu od asi pH 7,0 do asi pH 8,0.

Nejvýhodněji je rozmezí pH blízké neutrálnímu, pro změnu svinutí myšního endostatinu asi pH 7,5. Ještě výhodněji je rozmezí pH blízké neutrálnímu, pro změnu svinutí lidského endostatinu, od asi pH 7,0 do asi pH 8,0. Nejvýhodněji je rozmezí pH blízké neutrálnímu, pro změnu svinutí lidského endostatinu asi pH 7,5.

Výhodně je koncentrace endostatinového genového produktu v průběhu solubilizačního kroku od asi 0,2 do asi 20 mg/ml. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 2,5 mg/ml. Výhodně je koncentrace endostatinového genového produktu v průběhu kroku přeměny konformace svinutí od asi 0,02 do asi 2 mg/ml. Ještě výhodněji je koncentrace asi 0,25 mg/ml.

Výhodně se denaturační činidlo, které se používá v průběhu stupňů solubilizace a změny směru svinutí, volí ze souboru, do kterého patří močovina a guanidin hydrochlorid. Ještě výhodněji je denaturačním prostředkem močovina.

Výhodně je koncentrace močoviny od asi 4 M do asi 10 M v průběhu solubilizačního kroku. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 6 M.

Výhodně je koncentrace močoviny v průběhu kroku přeměny konformace svinutí od asi 2 M do asi 4 M. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 3,5 M. Výhodně je koncentrace guanidin hydrochloridu od asi 2 M do asi 8 M v průběhu solubilizačního kroku. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 4 M.

Výhodně je koncentrace guanidin hydrochloridu v průběhu kroku změny svinutí od asi 0,2 M do asi 2 M. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 1,5 M.

Výhodně se solubilizační a redukční kroky provádějí za přítomnosti redukčního činidla schopného redukovat disulfidové vazby na merkaptoskupiny. Výhodně je redukční činidlo vybráno ze skupiny, která sestává z DTT, BME, cysteinu a redukovaného glutathionu. Ještě výhodněji je redukčním činidlem DTT nebo cystein.

Výhodně je DTT přítomno v koncentraci od asi 2 mM do asi 10 mM v průběhu solubilizačního kroku. Ještě výhodněji je koncentrace asi 5 mM.

Výhodně, DTT je přítomen v koncentraci od asi 0,5 mM do asi 2 mM v průběhu kroku přeměny konformace svinutí. Ještě výhodněji je koncentrace asi 0,5 mM.

Výhodně, je redukovaný glutathion přítomen v koncentraci od asi 5 mM do asi 20 mM v průběhu solubilizačního kroku. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 10 mM.

Výhodně je redukovaný glutathion přítomen v koncentraci od asi 0,5 mM do asi 4 mM v průběhu kroku přeměny konformace svinutí. Ještě výhodněji je koncentrace asi 1 mM.

Výhodně, cysteine je přítomen v koncentraci od asi 5 mM do asi 20 mM v průběhu solubilizačního kroku. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 10 mM.

Výhodně, cysteine je přítomen v koncentraci od asi 0,5 mM do asi 4 mM v průběhu kroku přeměny konformace svinutí. Ještě výhodněji, je koncentrace asi 1 mM.

Výhodně je v průběhu kroku přeměny konformace svinutí, přítomno činidlo schopné podpořit záměnu disulfidových vazeb.

Výhodně se činidlo volí ze souboru, do kterého patří cystein a oxidovaný glutathion. Ještě výhodněji je tímto činidlem cystein.

Výhodně je v průběhu kroku přeměny konformace svinutí, přítomen cystein v koncentraci od asi 0,2 mM do asi 5 mM. Ještě výhodněji je tato koncentrace asi 1 mM.

Výhodně se disulfidové vazby vytvoří oxidací vzduchem v průběhu kroku přeměny konformace svinutí. Výhodně se krok oxidace vzduchem provádí po dobu od asi 12 do asi 96 hodin. Ještě výhodněji se krok oxidace vzduchem provádí po dobu od asi 24 do asi 72 hodin. Nejvýhodněji se krok oxidace vzduchem provádí po dobu asi 60 hodin.

Výhodně se převinutý endostatin dále čistí způsobem, který se vybere, mimo jiné, ze supiny postupů, zahrnující, mimo jiné, iontoměničovou chromatografii, hydrofobní interakční chromatografii a RP-HPLC.

Výhodně se pro způsob exprese, solubilizace, obrácení konformace svinutí a čištění používá endostatinových genů, které jsou buď myšího nebo lidského původu. Ještě výhodněji jsou tyto geny vybrány ze souboru, do kterého patří SEQ ID NO: 5-9.

Nové proteiny podle vynálezu jsou modifikované aminokyselinové sekvence lidského nebo myšího endostatinu, a uvedený protein může být popřípadě ihned zpracován (methioninem⁻¹), (alaninem⁻¹), (methioninem⁻², alaninem⁻¹), (serinem⁻¹), (methioninem⁻², serinem⁻¹), (cysteinem⁻¹), nebo (methioninem⁻², cysteinem⁻¹).

Kromě toho se vynález týká rekombinačních expresních vektorů obsahujících nukleotidové sekvence enkodující endostatin, variant a muteinů endostatinu, příbuzných mikrobiálních a eukaryotických expresních systémů a způsobů jejich výroby (zahrnující kroky exprimace, solubilizace, obrácení konformace svinutí, čištění).

Klonování DNA sekvencí enkodujících tyto proteiny se dá uskutečnit použitím intermediálních vektorů. Alternativně se může jeden gen klonovat přímo do vektoru, obsahujícího jiný gen. Pro spojení DNA sekvencí se dají použít linkery a adaptéry a také se dají nahradit ztracené sekvence, pokud restrikční místo bylo uvnitř regionu, o který máme zájem. Postupuje se tak, že genetický materiál (DNA), enkodující jeden polypeptid, peptidový linker a jiný polypeptid se zavede do vhodného expresního vektoru, jaký se používá k transformaci bakterií, kvasinek, hmyzích buněk nebo savčích buněk. Transformovaný organismus nebo buněčná linie se nechají růst a protein se izoluje obvyklými technikami. Výsledný produkt je tudíž nový protein, který má část prvního zvoleného proteinu nebo celý tento protein, navázanou(ý) linkerovým regionem ke všem částem druhého proteinu.

Dalším aspektem vynálezu jsou plasmidové DNA vektory pro použití při expresi uvedených proteinů. Tyto vektory obsahují nové DNA sekvence popsané shora, které kódují nové polypeptidy podle vynálezu. Vhodnými vektory, které mohou transformovat mikroorganismy nebo buněčné linie schopné exprimovat proteiny, jsou mezi jinými expresní vektory obsahující nukleotidové sekvence kódující proteiny, navázané na transkripční a translační regulační sekvence, které jsou vybrány podle použitých hostitelských buněk.

Vektory, zavádějící modifikované sekvence, jak byly popsány shora, jsou také součástí vynálezu a jsou použitelné při výrobě proteinů. Vektor, použitelný při tomto způsobu, také obsahuje vybrané regulační sekvence v operativním spojení s DNA kódujícími sekvencemi podle vynálezu, které jsou při tom schopné řídit replikaci a expresi ve vybraných hostitelských buňkách.

Způsoby výroby těchto proteinů představují další aspekt vynálezu. Způsob kultivace vhodných buněk nebo buněčných linií podle vynálezu, které byly transformovány vektorem, obsahujícím DNA sekvence kódující expresi nových multifunkčních proteinů. Vhodnými buňkami nebo buněčnými liniemi mohou být bakteriální buňky. Například jsou v této oblasti biotechnologií dobře známy jako hostitelské buňky různé kmeny *E. coli*. Příklady takovýchto kmenů jsou kmeny *E. coli* JM101 (Yanisch-Perron et al. Gene 33: 103-119, 1985) a MON105 (Obukowicz et al., Applied Environmental Microbiology 58:1511-1523, 1992), Součástí vynálezu je také exprese multifunkčních proteinů dosažená chromosomálním expresním vektorem pro *E. coli*, založeném na bakteriofágu Mu (Weinberg et al., Gene 126: 25-33, 1993). Při tomto způsobu lze také použít různé kmeny *B. subtilis*. Jak je známo odborníkům v oboru, jsou také dostupné buňky kvasinek, které lze také jako hostitelské buňky pro expresi polypeptidů podle vynálezu použít.

Pokud se používá exprese v cytoplasmě *E. coli*, mohou být geny enkódující proteiny podle vynálezu také konstruovány tak, že se navazují na 5' konec genové kodony, enkódující na N-zakončení proteinu Met-2-Ala-1, Met-2-Ser-1, Met-2-Cys-1 nebo Met-1. N-zakončení proteinů, vyráběných v cytoplasmě

E. coli se podrobí působení posttranslačního zpracování methionin aminopeptidasou (Ben Bassat et al., J. Bacteriol. 189:751-757, 1987) a popřípadě i jiných peptidas tak, že při expresi se methionin od N-zakončení odštěpí. Proteiny podle vynálezu mohou také obsahovat polypeptidy, které mají Met-1, Ala-1, Ser-1, Cys-1, Met-1 -Ala-1, Met-2-Ser-1, nebo Met-2-Cys-1 navázané na N-zakončení. Tyto mutantní proteiny mohou také být exprimovány v *E. coli* napojením sekrečního signálního peptidu na N-zakončení. Tento signální peptid je odštěpován od polypeptidu jako část procesu sekrece.

Definice zkratk

Následující seznam zkratk uvádí významy, které souhlasí s významy, které jsou zaměnitelně používány:

g = gram(y)
HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
mg = miligram
ml = mililitr
DTT = dithiothreitol
RT = pokojová teplota ("room temperature")
PBS = solanka pufovaná fosfátem ("phosphate buffered saline")

Následuje seznam definic různých termínů, které se zde používají:

Termín "protinádorový" znamená projevování aktivity, která růst nádorů *in vivo* zpomaluje nebo ruší, nebo která zabíjí nebo jim jinak škodí.

Termín "nativní sekvence" označuje aminokyselinu nebo sekvenci nukleové kyseliny, která je identická divokému typu nebo nativní formě genu nebo proteinu.

Termíny "mutantní aminokyselinová sekvence," "mutantní protein", "varianta proteinu", "mutein" nebo "mutantní polypeptid" označují polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci, která se odlišuje od nativní sekvence v důsledku toho, že má přidanou(é) aminokyselinu(y), vypuštěnou(é) aminokyselinu(y), nahrazenou(é) aminokyselinu(y) jinou (jinými) nebo jakoukoliv kombinaci těchto úprav nebo je enkódována nukleotidovou sekvencí ze záměrně vyrobené varianty, odvozené od nativní sekvence nebo chemicky syntetizované.

Termín "endostatin" znamená proteinový fragment kolagenu XVIII, který má antiangiogenní aktivitu. Tato aktivita uvedených fragmentů se dá stanovit mikrosoupravou pro testování angiogenéze rohovky nebo inhibicí růstu endotheliálních buněk nebo migrace *in vitro*. Výhodně, "myší endostatin" znamená sekvence zobrazené v SEQ ID 10, a "lidský endostatin" znamená sekvence zobrazené v SEQ ID NO 11.

Stručný popis přiložených obrázků

Obrázek 1 znázorňuje schematicky klonovaný endostatinový fragment

Je znázorněn C-terminální fragment kolagenu XVIII. Plasmid pMON24845 (SEQ ID NO: 8) enkoduje C-terminální fragment myšího kolagenu XVIII, Plasmid pMON20440

(SEQ ID NO: 9) enkoduje C-terminální fragment lidského kolagenu XVIII.

Obrázek 2 znázorňuje schematicky postup, kterým se provádí změna konformace svinutí endostatinu (dále též "obrácení konformace svinutí")

Jsou vyneseny optimální solubilizační podmínky v přítomnosti močoviny a DTT nebo cysteinu a obrácení konformace svinutí v přítomnosti cysteinu.

Obrázek 3 znázorňuje vyrobený myší endostatin převinutý za různých podmínek pH.

Výsledky RP-HPLC analýzy vyrobeného myšího endostatinu, po obrácení konformace svinutí při pH 7,5, pH 8,0 a pH 8,5 v 3,5 M močovinně.

Obrázek 4 Znázorňuje vyrobené myší endostatiny, převinuté při různých koncentracích močoviny.

Výsledky RP-HPLC analýzy vyrobeného myšího endostatinu, po obrácení konformace svinutí při koncentracích močoviny 3,0, 3,5 a 4,0 M, při pH 7,5.

Obrázek 5 znázorňuje vyrobený lidský endostatin, převinutý za různých podmínek pH

Výsledky RP-HPLC analýzy vyrobeného lidského endostatinu po obrácení konformace svinutí při pH 7,5, pH 8,0 a pH 7,5 při koncentraci močoviny 3,5 M.

Obrázek 6 znázorňuje vyrobený lidský endostatin převinutý při různých koncentracích močoviny.

Výsledky RP-HPLC analýzy vyrobeného lidského endostatinu po obrácení konformace svinutí při koncentraci močoviny 3,0, 3,5 a 4,0 M, při pH 7,5.

Obrázek 7 znázorňuje inhibici HMEC migrace myším endostatinem

Čištěný myší endostatin byl testován v buňkách HMEC při 15 a 30 $\mu\text{g/ml}$. Inhibice migrace byla pozorována při obou koncentracích.

Obrázek 8 znázorňuje inhibici CPAE migrace myším endostatinem

Čištěn myší endostatin byl testován na inhibici CPAE migrace při 5 a 30 $\mu\text{g/ml}$. Inhibice migrace byla pozorována při obou koncentracích.

Obrázek 8 znázorňuje inhibici proliferace endotheliálních buněk myším endostatinem.

Inhibice proliferace endotheliálních buněk myším endostatinem. Signifikantní inhibice byla pozorována při 20 $\mu\text{g/ml}$.

Obrázek 10 znázorňuje inhibici proliferace endotheliálních buněk lidským endostatinem.

Inhibice proliferace endotheliálních buněk lidským endostatinem. Při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ endostatinu byla pozorována signifikantní inhibice.

Podrobný popis vynálezu

Následující příklady ilustrují vynález podrobně, nicméně je jim třeba rozumět tak, že vynález není na tyto specifické příklady omezen. Různé další příklady budou pro odborníka po prostudování popisu vynálezu proveditelné, aniž by se tím odchýlil od myšlenky a rozsahu vynálezu. Předpokládá se, že veškeré takovéto příklady spadají do rozsahu vynálezu podle připojených nároků.

Obecné způsoby

Obecné způsoby klonování, exprimace a analýzy proteinů lze nalézt v příručce T. Maniatis, et al., Molecular Cloning, "A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, a tam uvedených odkazech, přičemž obé se tímto odkazem zahrnuje v celém rozsahu do popisu; a v příručce J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, "A Laboratory Manual", 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, a tam uvedených odkazech, přičemž obé se tímto odkazem zahrnuje v celém rozsahu do popisu.

Pokud není uvedeno jinak, veškeré speciální chemikálie byly získány od firmy Sigma, Co. (St. Louis, MO). Restriční endonukleázy a T4 DNA ligázy byly získány od New England

Biolabs (Beverly, MA) nebo Boehringer Mannheim (Indianapolis, V) nebo Promega (Madison, WI).

Kmeny a plasmidy

Bakteriální kmeny, použité v těchto pokusech, jsou přehledně uvedeny v tabulce 1. Plasmidy, které jsou v nich použité, nebo pro ně konstruované, jsou přehledně uvedeny v tabulce 2.

Transformace kmenů *E. coli*

Kmeny *E. coli* (tabulka 1), jako je DH5 alfa a DH10B (Life Technologies, Rockville, MD), a TGI (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) jsou používány pro transformační spojovací reakce, a jsou hostitely, používanými k přípravě plasmidu DNA pro transfekci savčích buněk. Kmeny *E. coli*, jako je JM101 (Yanisch Perron et al., Gene, 33: 103-119, 1985) a MON105 (Obukowicz, et al., Appl. a Envir. Micr., 58: 1511-1523, 1992) se dají použít pro expresi proteinů podle vynálezu v cytoplasmě nebo periplasmového prostoru.

Buňky DH5 alfa a DH10B, účinné pro subklonování, byly získány pod tímto názvem a dodávají se pro transformaci, přičemž se postupuje podle protokolu dodaného výrobcem. Kmeny *E. coli* JM101 a MON105 jsou schopné podpořit DNA s použitím a metody využívající CaCl_2 . Obvykle se 20 až 50 ml buněk nechá růst v LB půdě (1% Bakto-trypton, 0.5% Bakto-kvasinkový extrakt, 150 mM NaCl) na hustotu přibližně 1,0 absorbančních jednotek při 600 nanometrech (OD_{600}) při měření spektrometru "Baush & Lomb Spectronic spectrophotometer" (Rochester, NY). Buňky se shromažďují odstředěním kultury, resuspendované v roztoku CaCl_2 , jehož množství bylo rovno jedné pětině

objemu kultury [50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-Cl ((10 mM 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol hydrochlorid, pH 7,4] a jsou udržovány při 4°C po dobu 30 minut. Buňky se pak opět shromáždí odstředěním a resuspendují v roztoku CaCl_2 v množství rovném jedné desetíně objemu kultury. K DNA 0,2 ml těchto buněk se přidá navázaná DNA a vzorky se udržují při teplotě 4°C po dobu 30-60 minut. Vzorky se pak zahřejí na 42°C po dobu dvou minut a před protřepáním se do nich přidá 1,0 ml LB při 37°C na dobu 1 hodiny. Buňky z těchto vzorků se pak rozprostřou na destičky s živnou půdou (LB plus 1,5% Bakto-agaru), obsahující buď ampicilin (100 mikrogramů/ml, $\mu\text{g/ml}$) - pokud jsou vybírány transformanty resistantní vůči ampicilinu, nebo spektinomycin (75 $\mu\text{g/ml}$), pokud se vybírají transformanty resistantní vůči spektinomycinu. Destičky se inkubují přes noc při 37°C.

Kolonie se sklídí a inokulují do LB s přísadou vhodného antibiotika (100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu nebo 75 $\mu\text{g/ml}$ spektinomycinu) a nechají se růst při 37°C s použitím třepání.

Izolace a analýza DNA

Plasmid DNA se dá izolovat řadou různých způsobů a s použitím obchodně dostupných souprav, které jsou odborníkům v oboru známy. Plasmid DNA se izoluje s použitím soupravy Promega Wizard™ "Miniprep kit" (Madison, WI), izolačních souprav Qisgen QIAwell Plasmid (Chatsworth, CA) nebo Qiagen "Plasmid Midi" nebo "Mini kit". Tyto soupravy sledují stejný obecný postup izolace plasmidu DNA. Stručně řečeno, buňky jsou peletovány odstředěním (5000 x g), plasmid DNA se uvolní postupným působením NaOH/kyselina a buněčný debris se

odstraní odstředěním (10000 x g). Supernatant (obsahující plasmid DNA) se nanese na kolonu, obsahující pryskyřici, schopnou vázat DNA, kolona se promyje a eluuje se plasmid DNA. Po screeningu, které kolonie obsahují plasmid, o který nám jde, se buňky *E. coli* inokulují do 50-100 ml LB s přísadkou vhodného antibiotika a nechají se růst při 37°C ve vzdušném inkubátoru, přičemž se použije třepání. Čištěný plasmid DNA se použije pro sekvencování DNA, další digesce restriktčním enzymem, přísadné subklonování DNA fragmentů a transfekci do *E. coli*, savčích buněk nebo do buněk jiných typů.

Analýza sekvencí

Čištěný plasmid DNA se resuspenduje v deionizované H₂O a jeho koncentrace se stanoví měřením absorbance při 260/280 nm ve spektrometru Bausch a Lomb "Spectronic 601 UV spectrometer". Vzorky DNA jsou sekvencovány s použitím souprav ABI PRISM™ DyeDeoxy™ terminační chemickou metodou (Applied Biosystems Division of Perkin Elmer Corporation, Lincoln City, CA) (Part Number 401388 nebo 402078) podle protokolu, navrženého výrobcem, obvykle pozměněným pouze přidáním 5% DMSO do sekvencovací směsi. Sekvencovací reakce se provádějí v DNA termálním cyklovači (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT) s následním zesílením za doporučených podmínek. Vzorky se čistí, aby se odstranil přebytek barevných terminačních činidel pomocí kolon Centri-Sep™ (Princeton Separations, Adelphia, NJ) a pak se lyofilizují. Fluorescenčně značené sekvencovací reakce se provádějí při resuspendování v deionizovaném formamidu, a sekvencování se provádí na denaturačních gelech s obsahem 4,75% polyakrylamidu v 8M močovíně, s použitím

automatizovaných DNA sekvencerů ABI Model 373A a Model 377. Analýzuje se překrývání fragmentů DNA sekvence a údaje se vkládají do souvislostí s hlavní DNA s použitím softwaru "Sekvencher DNA analysis" (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Expresa endostatinu v *E. coli* v malém měřítku

Kmeny *E. coli* MON105 nebo JM101, které v sobě mají plasmid, který je předmětem zájmu, se množí při 37°C v prostředí M9 s přidavkem casaminových kyselin za použití třepání ve vzduchovém inkubátoru Model G25 od New Brunswick Scientific (Edison, NJ). Růst kultur se monitoruje při OD600, až tato hodnota dosáhne 1,0, poté se přidá nalidixová kyselina (10 mg/ml) v 0,1 N NaOH na finální koncentraci 50 µg/ml. Kultury se pak třepou při 37°C po dobu dalších tří až čtyř hodin. V průběhu celé této kultivační periody se udržuje vysoký stupeň aerace, aby se dosáhlo maximální produkce požadovaného genového produktu. Buňky se kontrolují pod světelným mikroskopem na přítomnost inkluzního tělesa (dále též "IB" = inclusion body). Z kultur se odeberou 1 ml alikvoty pro stanovení obsahu proteinu varem srážených buněk, působením redukujícího pufru na získaný produkt a elektroforesou přes SDS-PAGE (podle příručky Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1982). Kultura se odstředí (5000 x g) na koncentrát peletovaných buněk.

Expresa endostatinu v *E. coli* ve velkém (10 l) měřítku

Molekuly endostatinu byly všechny připraveny v fermentoru 10 l Biostat ETM (B. Braun Biotech Inc.,

Allentown PA). Použitým fermentačním prostředím byly soli M9 doplněné 2% kasaminových solí (Difco Laboratories, Detroit MI) a glukosy. Přibližně jeden mililitr rozmražené kultury byl přenesen do 3,8 l Fernbachovy třepací baňky obsahující 1,0 l živného roztoku, a pak byl inkubován při 37°C při rychlosti třepání 250 kmitů za minutu 12 hodin. Kultura z třepací baňky pak byla použita k inokulaci 9,0 l živného media v 10 l fermentoru. Fermentační podmínky byly následující: míchání = 1000 ot./min., mírné zavádění vzduchu = 15 litrů/min, udržování pH = 7,0 přidáváním NH_4OH , protitlak = 69 kPa, kontrolní stanovení množství rozpuštěného kyslíku > 30 %, a teplota = 37°C. Glukosa byla nejprve dávkována při koncentraci 15 g/l a koncentrace byla kontrolována na 2-5 g/l přidáváním 50% zásobního roztoku glukosy. Fermentační kultura byla pěstována zprvu při OD (550 nm) = 12-15 a indukována 50 mg/l nalidixové kyseliny. Fermentační směs byla sklizena čtyři hodiny po indukci kontinuálním průtokovým odstředěním.

Izolace inklusního tělesa ve velkém (10 l) měřítku

Pasta buněk z 10L fermentace byla resuspendována v přibližně 6,0 l pufru 50mM Tris/150 mM EDTA. Resuspendace byla provedena jedním průchodem v mikrofluidizeru® (Newton, MA) při 69 MPa a teplota byla udržována pod 8°C. Získaný homogenizát byl pak točen při 15000 x g po dobu 25 minut a míchán za účelem úpravy konsistence pomocí mixeru Ultr-Turrax. Resuspense buněčné pasty pak byla homogenizována trojím průchodem mikrofluidizérem "Microfluidizer™" (Newton, MA), který pracoval při tlaku 69 MPa. Teplota homogenizátu byla udržována na hodnotě menší než 6°C soustavou antikorových nádob, umístěných v ledové lázni. Inkusní tělesa byla pak izolována odstředěním buněčného homogenizátu

při přetížení 15000 x g po dobu 30 minut a odstraněním supernatantu. Pak byla inklusní tělesa promyta dvojím resuspendováním inklusních těles v chlazeném D.I. a odstředěním při 15000 x g po dobu 30 minut. Endostatin obsahující inklusní tělesa byla pak zmrazena při -70°C.

Izolace inklusního tělesa v malém měřítku

Sraženina buněk z 330 ml kultury *E. coli* se resuspenduje v 15 ml ultrazvukového pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). Tyto resuspendované buňky se pak podrobí působení ultrazvuku s použitím sondy s mikrozakončením a ultrazvukového zařízení "Sonicator Cell Disruptor" (Model W-575, Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Farmingdale, New York). Bylo použito trojí ultrazvukové působení v ultrazvukovém pufru, po kterém následovalo odstředění. Tím se dosáhlo narušení buněk a promytí inklusní tělesa (dále též "IB"). První ultrazvukové trhání trvalo 3 minuty a pak následovalo trhání po dobu 1 minuty; Závěrečné dvojí působení trvalo každé 1 minutu.

Extrakce obrácení konformace svinutí lidského a myšího proteinu ze sraženiny inklusních těles

Všechny kroky se provádějí při 4°C. Myší endostatinová inklusní tělesa byla rozmíchána v 6M močovíně, 5 mM DTT, 50 mM Bis-Tris Propanu, pH 10,8 při 2,5 mg/ml endostatinu. Tento roztok byl míchán po dobu 2 hodin a poté byl ke směsi přidán cystein (zásobní roztok 0,2 M, pH = 10,5) na koncentraci 10 mM. Takto získaná směs byla míchána 5 minut a pak zředěna na koncentraci 0,25 mg/ml endostatinu v 3,5 M močovíně, 100 mM Bis-Tris propanu při pH = 7,0. Směs pak byla míchána

60 hodin, aby se ukončila přeměna konformace svinutí proteinu, což bylo potvrzeno HPLC na reversní fázi.

Inklusní tělesa obsahující lidský endostatin byla rozmíchána v 10 mM cysteinu, 6M močovíně, 50 mM Bis-Tris propanu při pH 10,8 v takovém množství, které odpovídalo 2,5 mg/ml endostatinu. Získaná směs byla míchána 2 hodiny a pak k ní bylo přidáno 10 mM cysteinu (zásobní roztok 0,2 M, pH = 10,5) a míchání pokračovalo po dobu 5 minut. Tento roztok byl pak zředěn na koncentraci 0,25 mg/ml endostatinu v 3,0 M močovíně, 100 mM Bis-Tris propanu, pH 7,5 a míchán po dobu 60 hodin, čímž byl krok přeměny konformace svinutí ukončen.

Čištění

Čištění myšího nebo lidského endostatinu bylo dosaženo s použitím stejného postupu s použitím kyselého srážení, následovaného sloupcovou chromatografií na sulfopropylkové koloně. Převinutý vzorek byl zahuštěn přibližně na desetinu objemu ultrafiltrací a pH bylo sníženo na pH = 5,0 přidáním kyseliny octové. Takto upravená směs pak byla extenzivně dialyzována proti 5 mM kyselině octové, pH = 5,0. Sraženina byla odstraněna filtrací a filtrát byl nanesen na kolonu "Pharmacia S-Sepharose, HP". Kolona byla promyta 1 kolonovým objemem vyrovnávacího pufru a protein byl eluován s použitím 20ti kolonového objemu při gradientu od 50 mM fosfátu, pH 6,5 do stejného pufru, obsahujícího 0,4 M NaCl. Frakce byly analyzovány SDS-gelovou elektroforézou a RP-HPLC a spojeny, načež byla spojená směs dialyzována proti PBS a zmrazena.

V některých případech se dají svinuté proteiny afinitně čistit s použitím afinitních činidel jako jsou monoklonální

protilátky nebo podjednotky receptorů, navázané na vhodné matrici. Čištění se také dá provést s použitím jakékoliv varianty chromatografických způsobů jako jsou: iontoměniče, gelová filtrace nebo hydrofobní interakční chromatografie nebo HPLC na reversní fázi. Tyto a jiné způsoby čištění proteinu jsou podrobně popsány v publikaci "Methods in Enzymology", Volume 182 "Guide to Protein Purification", ed. Murray Deutscher, Academic Press, San Diego, California, 1990.

Analýza proteinů

Přečištěný protein se analyzuje RP-HPLC, elektrorozprašovací hmotnostní spektrometrií, sekvencováním aminokyselin a SDS-PAGE. Kvantifikace proteinu se provádí podle složení aminokyselin, RF-HPLC a Bradfordovým stanovením proteinů. V některých případech se mapování tryptického peptidu provádělo ve spojení s elektrorozprašovací hmotnostní spektrometrií, aby se identita proteinu potvrdila.

Test proliferace endotheliálních buněk

Test proliferace endotheliálních buněk byla provedena, jak je popsáno v publikaci Cao et al. (J. Biol. Chem. 271: 29461-29467, 1996). Stručně řečeno, lidské dermální mikrovaskulární endotheliální buňky (HdMVEC, Clonetics) nebo mikrovaskulární endotheliální buňky hovězí kůry nadledvinek (BacEnd, Incell, San Antonio, TX) byly udržovány v prostředí MCDB131 obsahujícím 5 % tepelně inaktivovaného fetálního hovězího sera (FBS, Hyclone), antibiotika, 100 µg/ml heparinu (Sigma) a 100 µg/ml endotheliálního mitogenu (Biomedical Technologies). Stékající monovrstvy při 2-5 průchodech byly

dispergovány v 0,05% trypsinu a resuspendovány v kompletním živném mediu. Pět set μl kompletního media s obsahem $1,25 \times 10^4$ buněk bylo naočkováno do jamek 24-jamkové destičky pro tkáňovou kulturu povlečených 0,1% želatinou (Sigma). Buňky byly inkubovány přes noc při $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ a po této době bylo živné prostředí nahrazeno 250 μl media s obsahem 5% FBS a s různými koncentracemi testovaných inhibitorů. Po 30 minutách inkubace bylo přidáno 250 μl media obsahujícího 1 ng/ml bFGF (R&D Systems) byl a buňky byly inkubovány dalších 72 hodin, přičemž byly buňky trypsinizovány a spočítány pomocí počítače Coulter .

Test migrace endotheliálních buněk

Test migrace endotheliálních buněk se provádí v podstatě stejně, jak bylo již popsáno (Gately et al., Cancer Res. 58:4887-4890, 1996). Aby se stanovila schopnost endostatinu inhibovat migraci endotheliálních buněk, byly provedeny migrační testy v komoře spojující jamky (Costar) obsahující polykarbonátové membrány s póry o velikosti 8 μm . Buňky použité v tomto testu byly buď lidské mikrovaskulární endotheliální buňky (Emory University, Atlanta, GA) nebo hovězí buňky pulmonárního arteriálního endothelu (Monsanto, St. Louis, MO). Buňky byly před použitím přes noc vyhladověny v MCDB131 + 0,1% BSA (lidské buňky) nebo DMEM + 0,1% BSA (hovězí buňky), odděleny a resuspendovány v stejném mediu v koncentraci 10^6 buněk/ml. Nižší strany zařízení byly povlečeny 0,1% želatinou po dobu 30 minut při 37°C , a pak byly do horní komory přidány připravené buňky v množství 2×10^5 buněk. Komora byla pak přemístěna do jamky obsahující chemoatraktant (bFGF nebo VEGF) v nižší komoře. Přes noc byla umožněna při 37°C migrace. Membrány pak byly fixovány a

vybarveny, a ve třech vysoce účinných oblastech byl spočítán počet buněk, které migrovaly na nižší stranu membrány ve 3 polích.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Konstrukce pMON24345 (SEQ ID NO: 8) a volba kmenů, produkujících vysoké hladiny myšího endostatínu

Úplná myší RNA (Clontech Laboratories Inc, Palo Alto, CA), 5 µg, byla míchána s 500 ng náhodného hexamerního primeru (Promega Corporation, Madison, WI), zahřívána 10 min při 65°C, pak ochlazená 2 min na ledu. K této směsi RNA/primer bylo přidáno 20 jednotek Rnasinu (Promega), pufr SuperScript II, DTT na finální koncentraci 0,01 M, dNTP mix (Boehringer) na finální koncentraci 0,005 M a 200 jednotek transkriptázy SuperScript II (Life Technologies Inc.). Tato reakční směs byla inkubována při 42°C po dobu 1,5 hodin a enzym byl inaktivován inkubační reakce při 70°C po dobu 5 minut. RNA byla odstraněna přidáním 2 jednotek RNázy H *E. coli* (Life Technologies Inc.) a reakční směs byla inkubována při 37°C po dobu 20 min. Dvouvláknová DNA byla generována reakcí polymerasového řetězce přičemž byly přidány dNTP na finální koncentraci 1,6 mM, 50 pmol primeru 5 prime myšího endostatínu (SEQ ID NO: 1), 50 pmol primeru 3 prime myšího endostatínu (SEQ ID NO: 2), "High Fidelity PCR" pufr a 2,5 jednotek "High-Fidelity enzymu" (Boehringer). Reakční směs byla inkubována při 95°C po dobu 3 min, pak opakovaně 10krát inkubována po dobu 15 minut při 94°C, 30 sekund při 50°C a 4 minuty při 72°C, pak opakovaně 15krát inkubována 15 sekund při 94°C, 30 sekund při 50°C, 4 min plus o 20 sekund déle

v každém cyklu při 72°C. Závěrem byla reakční směs inkubována při 72°C po dobu 7 minut.

Dvouvláknová DNA byla subklonována do pCAII vektoru (Invitrogen) přidáním 1 μ l reakční směsi PCR k 25 ng vektoru, 1 jednotkou T4 ligázy v ligázovém pufru. Ligasová reakční směs byla inkubována přes noc při 12°C. Navázaná DNA byla transformována do DH5 alfa kompetentní buňky (Life Technologies Inc., Rockville, MD) a ponechána růst na destičkách LB amp. Dva izoláty s inserty, potvrzenými EcoRI digescí, byly podrobeny další analýza. Inserty cDNA v těchto dvou izolátech, pMON24342 (SEQ ID NO: 5) a pMON24343 (SEQ ID NO: 6), byly podrobeny analýze DNA sekvencováním s použitím standard dideoxy-technologie. Za účelem konstrukce správně kódující DNA sekvence byly oba izoláty, tedy pMON24342 a pMON24343, podrobeny digescí působením ApaI. Fragment DNA myšího endostatinu ApaI a vektor pMON24342 plus 5 prime DNA sekvence kódující myší endostatin byly izolovány s použitím gelové extrakční soupravy "Qiaex II Gel Extraction Kit" (Qiagen, Germany). Fragmenty byly spojeny v 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 μ g/ml BSA a 1 jednotky T4 ligázy. Rekonstruovaný plasmid byl transformován do DH5 alfa kompetentní buňky, čímž se generoval pMON24344 (SEQ ID NO: 7). Plasmid pMON24344 byl digestován NcoI a HindIII a tento fragment byl izolován pomocí gelové extrakce (použitá souprava: "Qisex II Gel Extraction Kit"). Fragment pMON24344 NcoI/HindIII s napojením na NcoI/HindIII-digestovaný defosforylovaný expresní vektor *E. coli* pMON5723 v přítomnosti 50 mM tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 μ g/ml BSA a 1 jednotky T4 ligázy. Navázaná DNA byla transformována do MON105 a izoláty vybrány na destičky Spec LB, aby se generoval pMON24345 (SEQ ID NO: 8). Kmen *E. coli* MON105

obsahující pMON24345 byl indukován 10 mg/ml nalidixové kyseliny a myší endostatin, který byl v těchto buňkách exprimován, byl monitorován pomocí SDS-PAGE.

Příklad 2: Konstrukce pMON20440 (SEQ ID NO: 9) enkódující lidský endostatin

Celková lidská RNA (Clontech Laboratories Inc, Palo Alto, CA), 5 µg, byla smíchána s 500 ng náhodného hexamerního priméru, směs byla zahřívána po dobu 10 min při 65°C a pak ochlazena 2 minuty ledem. Do této směsi RNA/primér bylo přidáno 20 jednotek Rnasinu (Promega), pufru SuperScript II, DTT na finální koncentraci 0,01 M, dNTP mix (Boehringer) na finální koncentraci 0,005 M a 20 jednotek transkriptázy SuperScript II. Reakční směs byla inkubována při 42°C po dobu 1,5 hodin a enzym byl inaktivován inkubací reakční směsi při 70°C po dobu 5 minut. RNA byla odstraněna přidáním 2 jednotek RNázy H *E. coli* a inkubací reakční směsi při 37°C po dobu 20 minut. Dvouvláknová DNA byla generována polymerázovou řetězovou reakcí za přidavku dNTP na finální koncentraci 1,6 mM, 50 pmol priméru 5 prime lidského endostatinu (SEQ ID NO: 3), 50 pmol priméru lidského 3 prime (SEQ ID NO: 4), High-Fidelity PCR pufru a 2,5 jednotek High-Fidelity enzymu (Boehringer). Reakční směs byla inkubována při 95°C po dobu 3 min, pak 10 krát podrobena cyklu, sestávajícímu z 15 sekund inkubace při 94°C, 30 sekund inkubace při 50°C a 4 minut inkubace při 72°C, pak 15 krát cyklu, sestávajícímu z 15 sekund inkubace při 94°C, 30 sekund inkubace při 50°C a 4 minut plus o 20 sekund více v každém cyklu inkubace při 72°C. Finální reakční směs byla inkubována při 72°C po dobu 7 minut.

Dvouvláknová DNA byla digestována NcoI a HindIII a ligována do defosforylovaného expresního vektoru pMON2341 *E. coli*, digestovaného NcoI/HindIII v 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 µg/ml BSA a 1 jednotce T4 ligázy. Takto navázaná DNA byla transformována do kmene MON105 *E. coli* a v na destičkách Amp LB byly vybrány izoláty, generující pMON20440 (SEQ ID NO: 9). Kmen *E. coli* MON105 obsahující pMON20440 byl indukován s 10 mg/ml nalidixové kyseliny a lidský endostatin, exprimovaný v těchto buňkách, byl monitorován pomocí SDS-PAGE.

Příklad 3: Způsob obrácení konformace svinutí myšího endostatínu

Veškeré kroky se provádějí při 4°C. Inkluzní tělesa obsahující myší endostatin byla v koncentraci 2,5 mg/ml rozpuštěna v 6M močovíně, 5 mM DTT, 50 mM Bis-Tris Propanu, při pH = 10,8. Tento roztok byl míchán 2 hodiny a následně byl k němu přidán cystein (zásobní roztok 0,2 M, pH = 10,5) na výslednou koncentraci 10 mM. Takto získaná směs byla míchána 5 minut, a pak zředěna na 0,25 mg/ml endostatínu v 3,5 M močovíně, 100 mM Bis-Tris propanu, při pH = 7,0. Pak byla míchána 60 hodin, aby se dokončilo obrácení konformace svinutí proteinu, což bylo potvrzeno HPLC na reverzní fázi. Lze použít jiných podmínek pH koncentrací močoviny, ale při nižší účinnosti. Obrázky 3 a 4 ukazují HPLC křivky produkovaných myších endostatinů s obráceně svinutou konformací při různých podmínkách pH a při různých koncentracích močoviny. Obrázky 7, 8 a 9 ukazují inhibiční aktivity čištěného myšího endostatínu na proliferaci endotheliální buňky a testy migrace buňky.

Příklad 4: Způsob obrácení konformace svinutí lidského endostatinu

Všechny kroky se provádějí při 4°C. Inkluzní tělesa obsahující lidský endostatin byla rozpuštěna v 10 mM cysteinu, 6M močovíně, 50 mM Bis-Tris propanu, při pH 10,8, na koncentraci 2,5 mg/ml endostatinu. Tato směs byla míchána po dobu 2 hodin, byl přidán cystein v množství 10 mM (zásobní roztok 0,2 M, pH 10,5) a směs byla míchána 5 minut. Tento roztok byl pak zředěn na koncentraci 0,25 mg/ml endostatinu v 3,0 M močovíně, 100 mM Bis-Tris propanu při pH 7,5 a míchán 60 hodin, čímž se ukončil krok přeměny konformace svinutí. Lze použít jiných podmínek pH koncentrací močoviny, ale při nižší účinnosti. Obrázky 5 a 6 ukazují HPLC křivky produkovaných lidských endostatinů s obráceně svinutou konformací při různých podmínkách pH a při různých koncentracích močoviny. Obrázek 10 ukazuje inhibiční aktivity čištěného lidského endostatinu na proliferaci endotheliální buňky a testy migrace buňky.

Průmyslové použití

Odborník v oboru může po prostudování shora uvedeného popisu a nároků, že solubilizace, změna konformace svinutí a čištění, jak jsou popsány shora, představují oproti dosud publikovaným metodám pro čištění endostatinu z bakterií, převratná zlepšení. Výroba endostatinu v komerčním měřítku pro použití v předklinických a klinických testech, vyžaduje velká množství rozpustného materiálu, popřípadě s upravenou konformací svinutí, která má požadované biologické vlastnosti. Komerční vývoj endostatinu jako terapeutického produktu vyžaduje důkladné zjištění vlastností používaného materiálu, který se musí chovat stejně při všech aplikacích.

Rozpustný endostatin s vhodně upravenou konformací svinutí šroubovice je tudíž pro testy účinnosti *in vitro* a *in vivo*, míry aktivity, farmakokinetiky a farmakodynamiky více žádán, než suspenze nerozpustného materiálu tohoto proteinu. Převratně vylepšený způsob exprimace, solubilizace, změny konformace svinutí šroubovice, čištění a charakterizace tohoto materiálu uvedená v tomto popisu výborně vyhovují následným testům, zaměřeným na vývoj endostatinu, endostatinových fragmentů, muteinů, inserteinů, permuteinů, jejich chimér nebo jejich konjugátů s jinými antiangiogenními proteiny nebo malými molekulami, které jsou použitelné jako sloučeniny při léčení poruch angiogenéze, včetně rakoviny.

Všechny odkazy, patenty nebo aplikace, které jsou zde citovány, jsou vloženy do tohoto popisu v celé své celistvosti tak, jako by byly zde napsány.

Tabulky

Tabulka 1: Kmeny

Označení	Popis nebo genotyp	Odkaz/Zdroj
DHSaTM	F',phi80 dlacZdeltaM15, delta(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk ⁺ ,mk ⁺),phoA, supE44, lambda-, thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies, Rockville, Maryland
DH10B	F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φdlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ ⁺ rpsL nupG	Life Technologies, Rockville, Maryland
JM101 (ATCC # 33876)	delta (pro lac), supE, thi, F'(traD36, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , IacZdeltaM15)	Yanisch-Perron, et al., <i>Gene</i> , 33: 103-119, 1985
MON105 (ATCC # 55204)	F',lambda-,IN(rrnD, rrnE)1, rpoD ⁺ , rpoH358	Obukowicz, et al., <i>Appl. a Envir. Micr.</i> , 58: 1511-1523, 1992
TG1	delta(lac-pro), supE, thi-1, hsdD5/F'(traD36,proA ⁺ B ⁺ ,lacI ^q , lacZdeltaM15)	Amersham Corp., Arlington Heights, Illinois

Tabulka 2: Plasmidy

Plas- mid	SEQ ID NO:	Mar- ker	Popis	Zdroj
pMON 2341		Amp ^R	Generický expresní vektor Amp-resistentní <i>E. coli</i> , obsahující <i>E. coli</i> recA1 promotor a G10L ribosomové vazebné místo, gen chloramfenikol acetyl transferázy (<i>cat3</i>) gen a ori M13	Laboratorní sbírka
pMON 5723		Spec ^R	Generický expresní vektor Spec-resistentní <i>E. coli</i> obsahující <i>E. coli</i> recA1 promotor a G10L ribosomové vazebné místo	(Olins a Rangwala, <i>Methods Enzymol.</i> 185 (Gene Expression Technol.): 115-119, 1990)
pCRII		Amp ^R	Komerční vektor, klonující PCR fragment(TA)	Invitrogen
pMON 24342	#5	Amp ^R	pCR II (TA) klonovací vektor + PCR fragment, enkódující myši endostatin, včetně C-terminálního regionu nativního myšního kolagenu XVIII. EcoRI fragment v pCRII (<i>Amino acids</i> 1104-1288)	Tato práce
pMON 24343	#6	Amp ^R	pCR II (TA) klonovací vektor + PCR fragment enkódující myši endostatin, zahrnující C-terminální region nativního myšního kolagenu XVIII. EcoRI fragment v pCRII (<i>Amino acids</i> 1104-1288)	Tato práce
pMON 24344	#7	Amp ^R	pCR II (TA) klonovací vektor + PCR fragment enkódující myši endostatin, zahrnující C-terminální region nativního myšního kolagenu XVIII. EcoRI fragment v pCRII (<i>Amino acids</i> 1104-1288)	Tato práce
pMON 24345	#8	Spec ^R	pMON5723 NcoI/HindIII + NcoI/HindIII fragment myšního endostatinu, zahrnující C-terminální region nativního myšního kolagenu XVIII (<i>Amino acids</i> 1104-1288)	Tato práce
pMON 20440	#9	Spec ^R	pMON2341 NcoI/HindIII + NcoI/HindIII enkódující lidský endostatin, včetně C-terminalního regionu nativního lidského kolagenu XVIII	Tato práce

Tabulka 3: Tabulka korelace SEQ ID NO

SEQ ID NO:	Sekvence	Popis
1	gcgcgccccacggctcatactcatcaggnc;	5 prime PCR primer pro myši endostatin
2	gcgcgcaagcttattattttggagaaagaggtcatgaag;	3 prime PCR primeru pro myši endostatin
3	GCGCGCCCAT GGCTCACAGC CACCGCGACT TCCAGCCGGT GCTCCACCTG GTTGGCGCTCA ACAGCCCCCT G;	5 prime PCR primer pro lidský endostatin
4	GCGCGCAAGC TTATTACTTG GAGGCAGTCA TGAAGCTGTT CTCAATGCAG AGCACGATGT AGGCGTGATG GCAGCTCGC;	3 prime PCR primer pro lidský endostatin
5		pMPN42342 EcoR1 insert enkódující myši endostatin
6		pMON42343 EcoR1 insert enkódující myši endostatin
7		pMON42344 EcoR1 insert enkódující myši endostatin
8		pMON42345 EcoR1 insert enkódující myši endostatin
9		pMON20940 enkódující lidský endostatin
10	AHTHQDFQPVLHLVALNTPLSGGMRGIRGADFQCFQQARA VGLSGTFRAFLSS RLQDLYSIVRRADRGSPVIVNLKDEVLSPSWDSLFSGSQG QLQPGARIFSF DGRDV LRHPAWPQKSVWHGSDPSGRRLMESYCETWRTETTGTATGQ ASSLLSGRLLLEQK AASCHNSYIVLCIENSFMTSFSK;	Aminokyselinová sekvence myšiho endostatinu
11	AHSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARA VGLAGTFRAFLSS RLQDLYSIVRRADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEG PLKPGARIFSF DKGDV LAHPTWPQKSVWHGSDPNRRLTESYCETWRTAPSATGQ ASSLLGGRLLGQS AASCHHAYIVLCIENSFMTA-SK;	Aminokyselinová sekvence lidského endostatinu

PŘEHLED SEKVENCÍ

<110> Harding, E.I. Violand, B.N.	
<120> Method of producing mouse and human endostatin	
<130> C_3071-0	
<150> 60/075,587	
<151> 1998-02-23	
<160> 11	
<170> FastSEQ for Windows Version 3.0	
<210> 1	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> lidský	
<400> 1	
gcgcgccccat ggctcact catcaggac	29
<210> 2	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> lidský	
<400> 2	
gcgcgcaagc ttattatttg gagaaagagg tcatgaag	38
<210> 3	
<211> 71	
<212> DNA	
<213> lidský	
<400> 3	
gcgcgccccat ggctcacagc caccgcgact tccagccggt gctccacctg gttgcgctca acagccccct g	60 71
<210> 4	
<211> 79	
<212> DNA	
<213> lidský	
<400> 4	
gcgcgcaagc ttattacttg gaggcagtc tgaagctgtt ctcaatgcag agcacgatgt aggcgtgatg gcagctcgc	60 79

<210> 5
<211> 620
<212> DNA
<213> lidský

<400> 5

gcgcgccccat	ggctcatact	catcaggact	ttcagccagt	gctccacctg	gtggcactga	60
acacccccct	gtctggaggg	atgcgtggta	tccgtggagc	agatttccag	tgcttccagc	120
aagccccgagc	cgtggggctg	tccggcacct	tccgggcttt	cctgtcctct	aggctgcagg	180
atctctatag	catcgtgcgc	cgtgctgacc	gggggtctgt	gcccacgtc	aacctgaagg	240
acgaggtgct	atctcccagc	tgggactccc	tgttttctgg	ctcccagggt	caactgcaac	300
ccggggccccg	catcttttct	tttgacggca	gagatgtcct	gagacaccca	gcctggccgc	360
agaagagcgt	atggcacggc	tccgacccca	gtgggaggag	gctgatggag	agttactgtg	420
agacatggcg	aactgaaact	actggggcta	caggtcaggc	ctcctccctg	ctgtcaggca	480
ggctcctgga	acagaaagct	gcgagctgcc	acaacagcta	catcgtcctg	tgcatcgaga	540
atagcttcat	gacctcttct	tcaagccgaa	ttccagcaca	ctggcgncgt	tactagtgat	600
ccgagctcgt	accaagttaa					620

<210> 6
<211> 582
<212> DNA
<213> lidský

<400> 6

gcgcgccccat	ggctcatact	catcaggact	ttcagccagt	gctccacctg	gtggcactga	60
acacccccct	gtctggaggg	atgcgtggta	tccgtggagc	aaatttccag	tgcttccagc	120
aagccccgagc	cgtggggctg	tccggcacct	tccgggcttt	cctgtcctct	aggctgcagg	180
atctctatay	catcgtgcgc	cgtgctgacc	gggggtctgt	gcccacgtc	aacctgaagg	240
acgaggtgct	atctcccagc	tgggactccc	tgttttctgg	ctcccagggt	caactgcaac	300
ccggggccccg	catcttttct	tttgacggca	gagatgtcct	gagacaccca	gcctggccgc	360
agaagagcgt	atggcacggc	tccgacccca	gtgggaggag	gctgatggag	agttactgtg	420
agacatggcg	aactgaaact	actggggcta	caggtcaggc	ctcctccctg	ctgtcaggca	480
ggctcctgga	acagaaagct	gcgagctgcc	acaacagcta	catcgtcctg	tgcatcgaga	540
atagcttcat	gacctcttct	tccaaataat	aagcttggcg	cg		582

<210> 7
<211> 580
<212> DNA
<213> lidský

<400> 7

gcgccccatg	ctcatactca	tcaggacttt	cagccagtgc	tccacctggt	ggcactgaac	60
acccccctgt	ctggaggcat	gcgtggtatc	cgtggagcag	atttccagt	cttccagcaa	120
gcccagagccg	tggggctgtc	gggcaccttc	cgggctttcc	tgctcctctag	gctgcaggat	180
ctctatagca	tcgtgcgcgc	tgctgaccgg	gggtctgtgc	ccatcgtcaa	cctgaaggac	240
gaggtgctat	ctcccagctg	ggactccctg	ttttctggct	cccagggtca	agtgaacccc	300
ggggccccgca	tcttttcttt	tgacggcaga	gatgtcctga	gacacccagc	ctggccgcag	360
aagagcgtat	ggcacggctc	ggaccccagt	gggaggaggc	tgatggagag	ttactgtgag	420
acatggcgaa	ctgaaactac	tggggctaca	ggtcaggcct	cctccctgct	gtcaggcagg	480
ctcctggaac	agaaagctgc	gagctgccac	aacagctaca	tcgtcctgtg	cattgagaat	540
agcttcatga	cctcttttct	caaataataa	gcttgcgcgc			580

-40-
S

01.05.01

<210> 8
<211> 568
<212> DNA
<213> lidský

<400> 8

catgctcata	ctcatcagga	ctttcagcca	gtgctccacc	tggtggcact	gaacaccccc	60
ctgtctggag	gcatgcgtgg	tatccgtgga	gcagatttcc	agtgttcca	gcaagcccga	120
gccgtggggc	tgctggggcac	cttccgggct	ttcctgtcct	ctaggctgca	ggatctctat	180
agcatcgtgc	gccgtgctga	ccgggggtct	gtgcccacgc	tcaacctgaa	ggacgaggtg	240
ctatctccca	gctgggactc	cctgttttct	ggctcccagg	gtcaagtgca	acccggggcc	300
cgcactcttt	cttttgacgg	cagagatgtc	ctgagacacc	cagcctgggc	gcagaagagc	360
gtatggcacg	gctcggaccc	cagtgggcgg	aggctgatgg	agagttactg	tgagacatgg	420
cgaactgaaa	ctactggggc	tacaggtcag	gcctcctccc	tgctgtcagg	caggctcctg	480
gaacagaaa	ctgcgagctg	ccacaacagc	tacatcgtcc	tgtgcattga	gaatagcttc	540
atgacctctt	tctccaaata	ataagctt				568

<210> 9
<211> 563
<212> DNA
<213> lidský

<400> 9

catggcacag	ccaccgcgac	ttccagccgg	tgctccacct	ggttgcgctc	aacagccccc	60
tgtcaggcgg	catgcggggc	atccgcgggg	ccgacttcca	gtgtttccag	caggcgcggg	120
ccgtggggct	ggcgggcacc	ttccgcgctt	tcctgtcctc	gcgcctgcag	gacctgtaca	180
gcatcgtgcg	ccgtgccgac	cgcgcagccg	tgcccacgtg	caacctcaag	gacgagctgc	240
tgtttcccag	ctgggaggct	ctgtttctcag	gctctgaggg	tccgctgaag	cccgggggcac	300
gcactcttct	ctttgacggc	aaggacgtcc	tgaggcaccc	cacctggccc	cagaagagcg	360
tgtggcatgg	ctcggacccc	aacgggcgca	ggctgaccga	gagctactgt	gagacgtggc	420
ggacggaggc	tccctcggcc	acggggccagg	cctcctcgct	gctggggggc	aggtcctctg	480
ggcagagtgc	cgcgagctgc	catcacgcct	acatcgtgct	ctgcattgag	aacagcttca	540
tgactgcctc	caagtaataa	gct				563

<210> 10
<211> 124
<212> PRT
<213> lidský

<400> 10

Ala	His	Thr	His	Asp	Val	His	Val	Ala	Asn	Thr	Ser	Gly	Gly	Met	Arg
1				5					10					15	
Gly	Arg	Gly	Ala	Asp	Cys	Ala	Arg	Ala	Val	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Ala
			20					25					30		
Ser	Ser	Arg	Asp	Tyr	Ser	Val	Arg	Ala	Asp	Arg	Gly	Ser	Val	Val	
		35				40					45				
Asn	Lys	Asp	Val	Ser	Ser	Trp	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Arg
	50					55				60					
Ser	Asp	Gly	Arg	Asp	Val	Arg	His	Ala	Trp	Lys	Ser	Val	Trp	His	Gly
65				70					75					80	
Ser	Asp	Ser	Gly	Arg	Arg	Met	Ser	Tyr	Cys	Thr	Trp	Arg	Thr	Thr	
			85					90					95		
Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Gly	Arg	Lys	Ala	Ala	Ser	Cys	His
			100					105					110		
Asn	Ser	Tyr	Val	Cys	Asn	Ser	Met	Thr	Ser	Ser	Lys				
			115					120							

<210> 11
<211> 123
<212> PRT
<213> lidský

<400> 11
Ala His Ser His Arg Asp Val His Val Ala Asn Ser Ser Gly Gly Met
1 5 10 15
Arg Gly Arg Gly Ala Asp Cys Ala Arg Ala Val Gly Ala Gly Thr Arg
20 25 30
Ala Ser Ser Arg Asp Tyr Ser Val Arg Arg Ala Asp Arg Ala Ala Val
35 40 45
Val Asn Lys Asp Ser Trp Ala Ser Gly Ser Gly Lys Gly Ala Arg Ser
50 55 60
Asp Gly Lys Asp Val Arg His Thr Trp Lys Ser Val Trp His Gly Ser
65 70 75 80
Asp Asn Gly Arg Arg Thr Ser Tyr Cys Thr Trp Arg Thr Ala Ser Ala
85 90 95
Thr Gly Ala Ser Ser Gly Gly Arg Gly Ser Ala Ala Ser Cys His His
100 105 110
Ala Tyr Val Cys Asn Ser Met Thr Ala Ser Lys
115 120

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby endostatinu, při kterém se provádějí následující kroky:

- (a) kultivují se hostitelské buňky, které exprimují endostatinový gen;
- (b) produkt uvedené genové exprese se získává;
- (c) solubilizuje se uvedený genový produkt při zvýšeném pH;
- (d) mění se konformace svinutí uvedeného solubilizovaného genového produktu při zhruba neutrálním pH;
a
- (e) izolují se vhodně svinuté formy uvedeného genového produktu.

2. Způsob výroby endostatinu, při kterém se provádějí následující kroky:

- (a) kultivují se hostitelské buňky, které exprimují endostatinový gen;
- (b) získává se produkt uvedené genové exprese;
- (c) mění se konformace svinutí uvedeného solubilizovaného genového produktu při zhruba neutrálním pH;
- (e) izolují se vhodně svinuté formy uvedeného genového produktu.

3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedené zvýšené pH v průběhu solubilizačního kroku je od asi pH 9 do asi pH 11,5.

4. Způsob podle nároku 3, vyznačující se tím, uvedené zvýšené pH je od asi pH 10 do asi pH 11.

5. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, uvedené zvýšené pH je asi pH 10,5.

6. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že v kroku přeměny konformace svinutí je pH blízké neutrálnímu od asi pH 6 do asi pH 8,5.

7. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že uvedené pH blízké neutrálnímu v kroku přeměny konformace svinutí je od asi pH 7,0 do asi pH 8,0.

8. Způsob podle nároku 7, vyznačující se tím, že uvedené pH blízké neutrálnímu v kroku přeměny konformace svinutí asi pH 7,5.

9. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že uvedené pH blízké neutrálnímu v kroku přeměny konformace svinutí je od asi pH 7,0 do asi pH 8,0.

10. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že uvedené pH blízké neutrálnímu v kroku přeměny konformace svinutí je asi pH 7,5.

11. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že močovina je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomna v koncentraci od asi 4 M do asi 10 M.

12. Způsob podle nároku 11, vyznačující se tím, že močovina je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomna v koncentraci asi 6 M.

13. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že močovina je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomna v koncentraci od asi 0,5 M do asi 5 M.

14. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že močovina je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomna v koncentraci asi 3,5 M.

15. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že guanidin hydrochlorid je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku, přítomen v koncentraci od asi 2 M do asi 8 M.

16. Způsob podle nároku 15, vyznačující se tím, že guanidin hydrochlorid je v průběhu uvedeného solubilization kroku přítomen v koncentraci asi 4 M.

17. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že guanidin hydrochlorid je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci od asi 0,2 M do asi 2 M.

18. Způsob, podle nároku 17, vyznačující se tím, že guanidin hydrochlorid je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci asi 1,5 M.

19. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se provádí v přítomnosti redukčního činidla, které je schopné redukovat disulfidické vazby na merkaptoskupiny.

20. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že uvedené redukční činidlo je zvoleno ze souboru, do kterého patří DTT, BME, cystein a redukovaný glutathion.

21. Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že DTT je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci od asi 2 mM do asi 10 mM.

22. Způsob podle nároku 21, vyznačující se tím, že DTT je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomno v koncentraci asi 5 mM.

23 Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že DTT je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci od asi 0,2 mM do asi 2 mM.

24. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že DTT je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci asi 0,5 mM.

25. Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že redukovaný glutathion je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci od asi 5 mM do asi 20 mM.

26. Způsob podle nároku 25, vyznačující se tím, že redukovaný glutathion je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci asi 10 mM.

27. Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že redukovaný glutathion je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci od asi 1 mM do asi 4 mM.

28. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že redukovaný glutathion je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci asi 2 mM.

29. Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že cysteine je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci od asi 5 mM do asi 20 mM.

30. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že cysteine je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci asi 10 mM.

31. Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že cystein je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci od asi 0,5 mM do asi 4 mM.

32. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že cystein je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci asi 1 mM.

33. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace

svinutí činidlem, je přítomno činidlo, schopné podpořit změnu disulfidických vazeb.

34. Způsob podle nároku 33, vyznačující se tím, že uvedené činidlo je zvoleno ze souboru, do kterého patří, cystein a oxidovaný glutathion.

35. Způsob podle nároku 34, vyznačující se tím, že cystein je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci od asi 0,2 mM do asi 5 mM.

36. Způsob podle nároku 35, vyznačující se tím, že cystein je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci asi 1 mM.

37. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že disulfidické vazby se v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí vytvářejí oxidací vzduchem.

38. Způsob podle nároku 37, vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace vzduchem se provádí po dobu od asi 12 hodin do asi 96 hodin.

39. Způsob podle nároku 38, vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace vzduchem se provádí po dobu od asi 24 hodin do asi 72 hodin.

40. Způsob podle nároku 39, vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace vzduchem se provádí po dobu asi 60 hodin.

41. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený genový produkt je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci od asi 1 do asi 20 mg/ml.

42. Způsob podle nároku 41, vyznačující se tím, že uvedený genový produkt je v průběhu uvedeného solubilizačního kroku přítomen v koncentraci asi 2,5 mg/ml.

43. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený genový produkt je přítomen v koncentraci od asi 0,1 do asi 5 mg/ml v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí.

44. Způsob podle nároku 43, vyznačující se tím, že uvedený genový produkt je v průběhu uvedeného kroku, v němž se mění konformace svinutí, přítomen v koncentraci asi 0,25 mg/ml.

45. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že se při něm provádí krok čištění endostatínu způsobem, zvoleným ze skupiny sestávající z chromatografie na iontoměniči, hydrofobní interakční chromatografie a RP-HPLC.

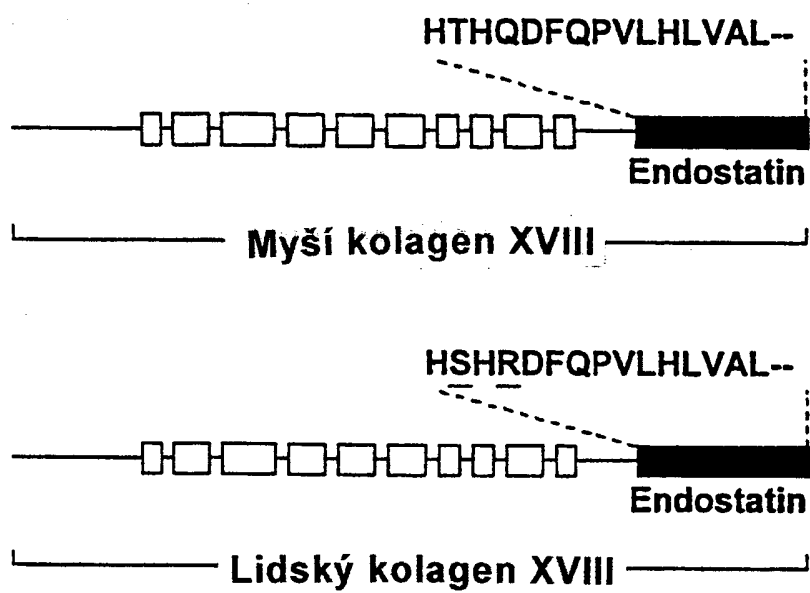
46. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený endostatinový gen obsahuje DNA, enkódující ne-lidský zvířecí endostatin.

47. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený endostatinový gen je zvolen ze skupiny, sestávající z SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; a SEQ ID NO: 8.

48. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený endostatinový gen obsahuje DNA, enkódující lidský endostatin.

49. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený endostatinový gen obsahuje SEQ ID NO: 9.

Obr. 1



Obr. 2

SOLUBILIZACE IBS V

6M MOČOVINĚ, 5mM DDT (myší) nebo 10 mM cysteinu (lidský), pH 10,8

MÍCHÁNÍ 2 HODINY



PŘIDÁNÍ 10 mM CYSTEINU,

MÍCHÁNÍ 5 MINUT



10-TI NÁSOBNÉ ZŘEDĚNÍ NA

5,5 močovina (myší) nebo 3,0 M močovina (lidský) a

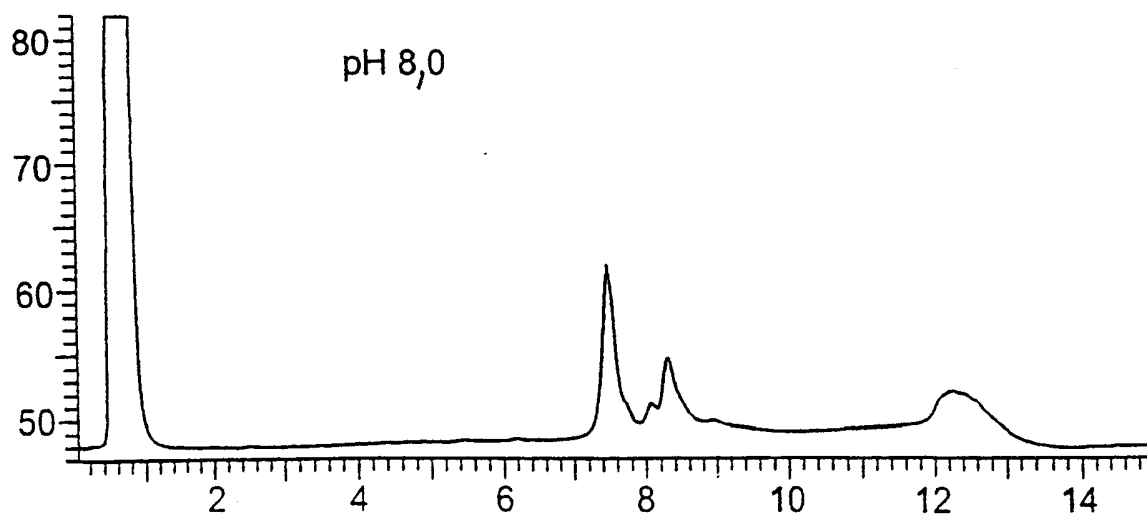
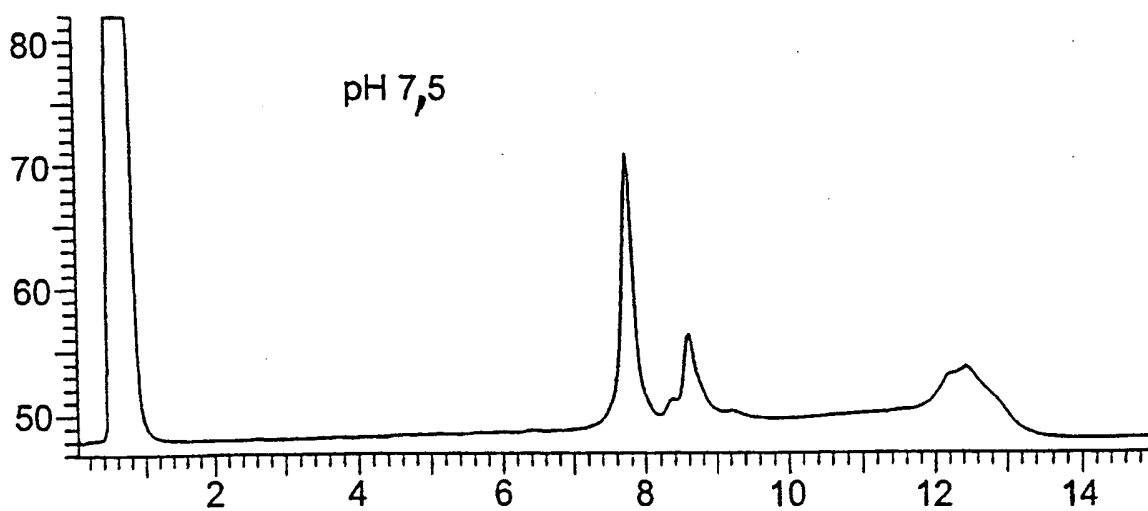
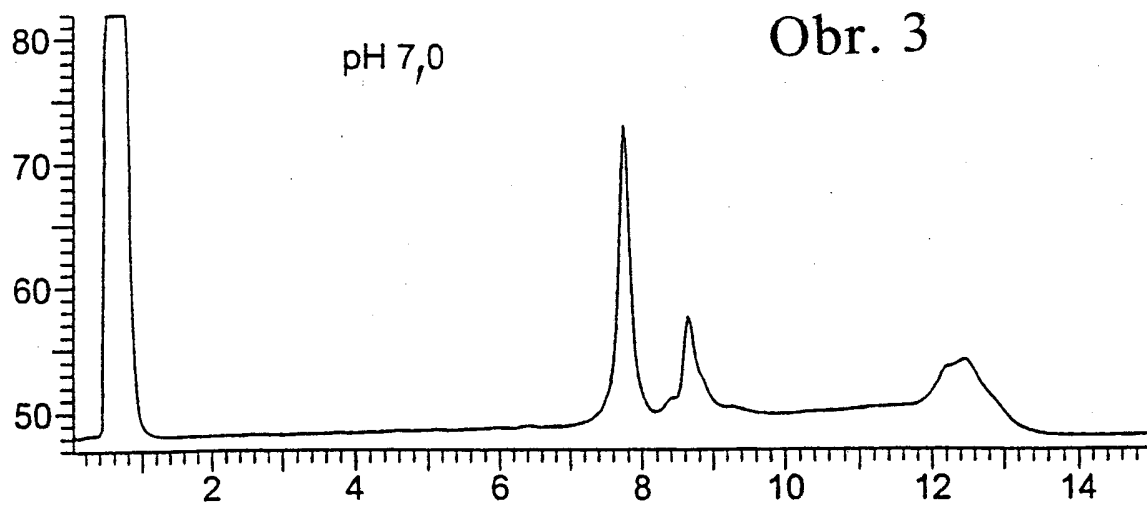
pH 7,0 (myší) nebo pH 7,5 (lidský)

MÍCHEJ 60 HODIN

01.08.01

PV 2000-3058

3 / 10

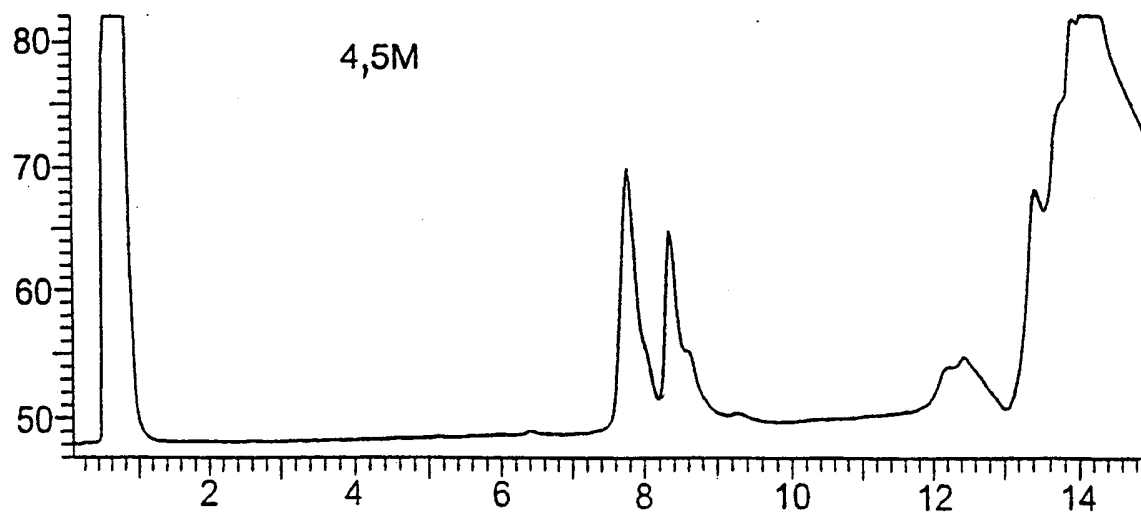
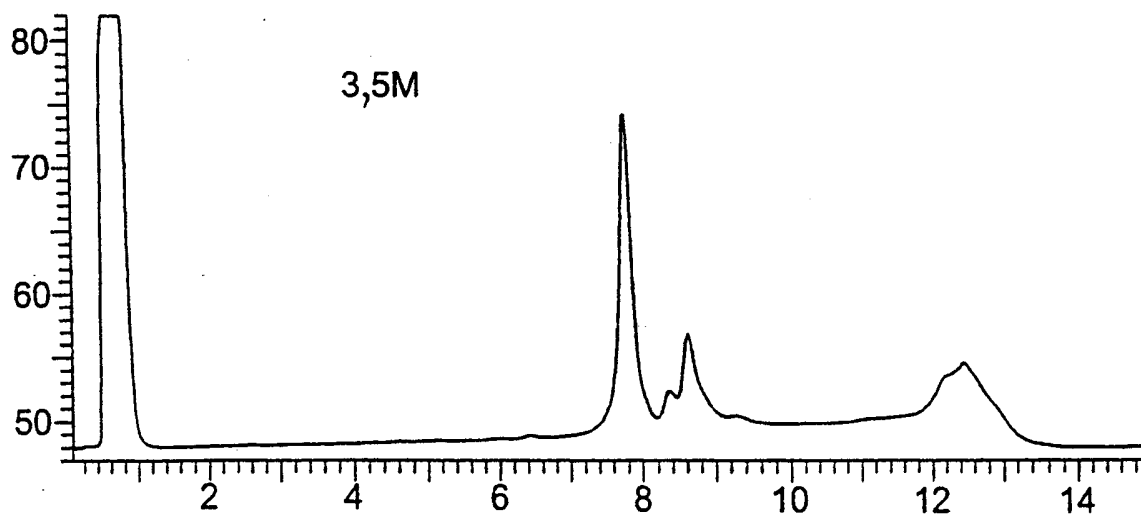
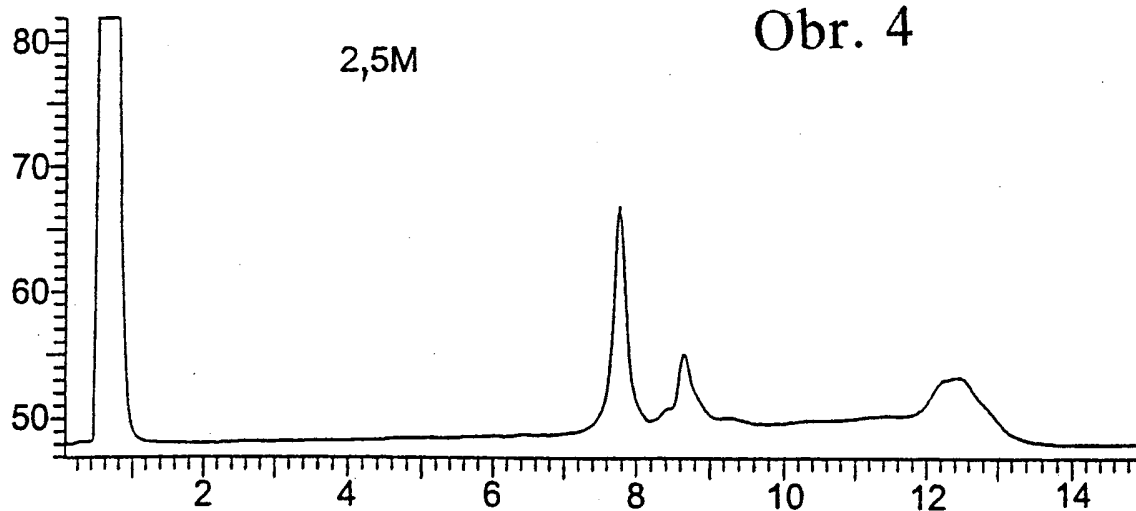


01.08.01

PV 2000-3058

4 / 10

Obr. 4

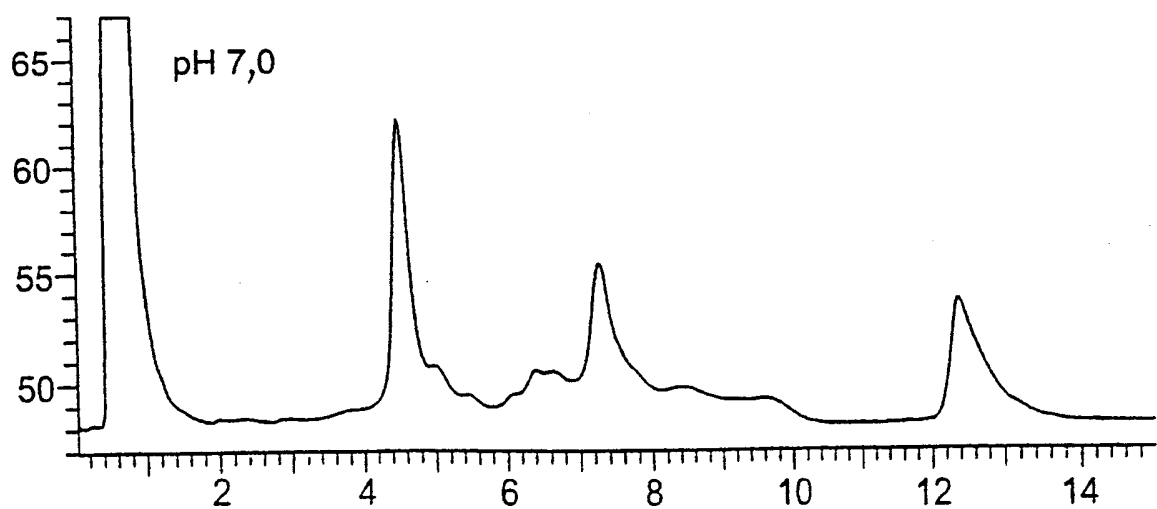
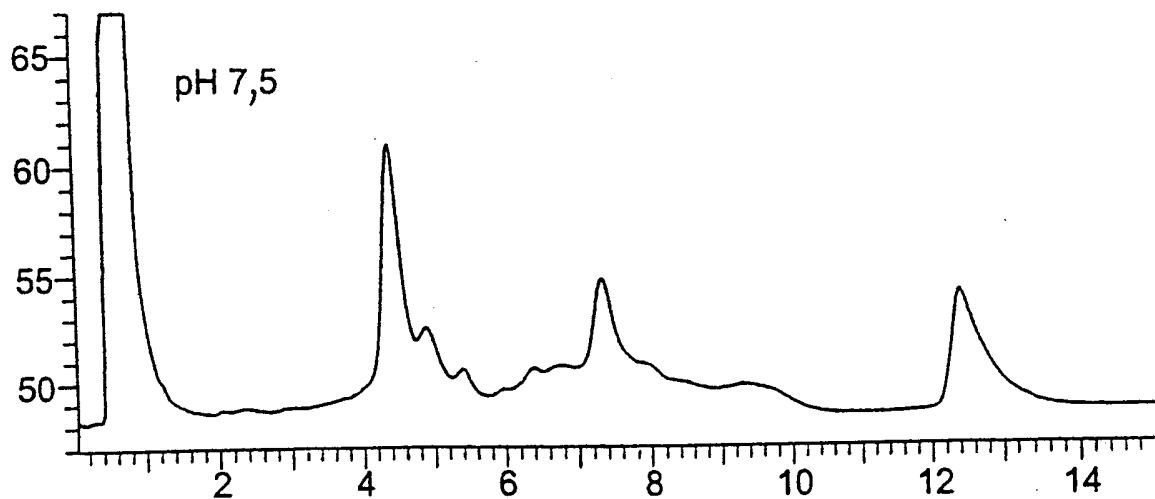
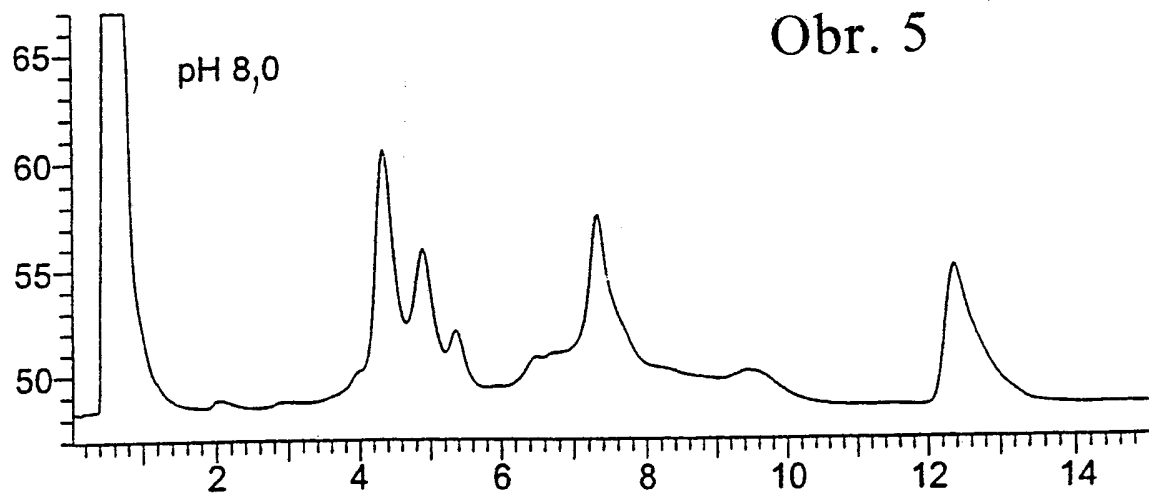


01.08.01

PV 2000-3058

5 / 10

Obr. 5

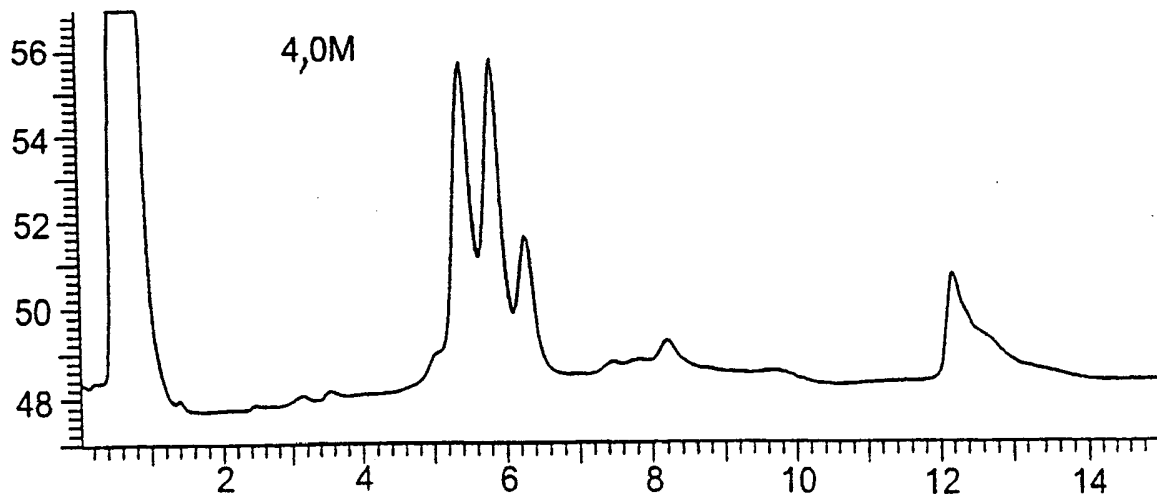
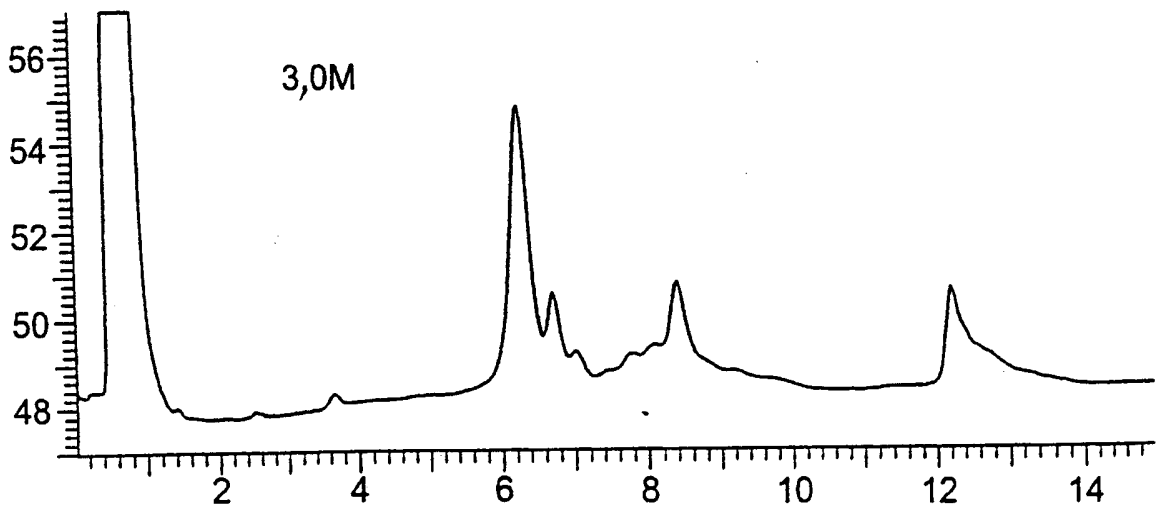
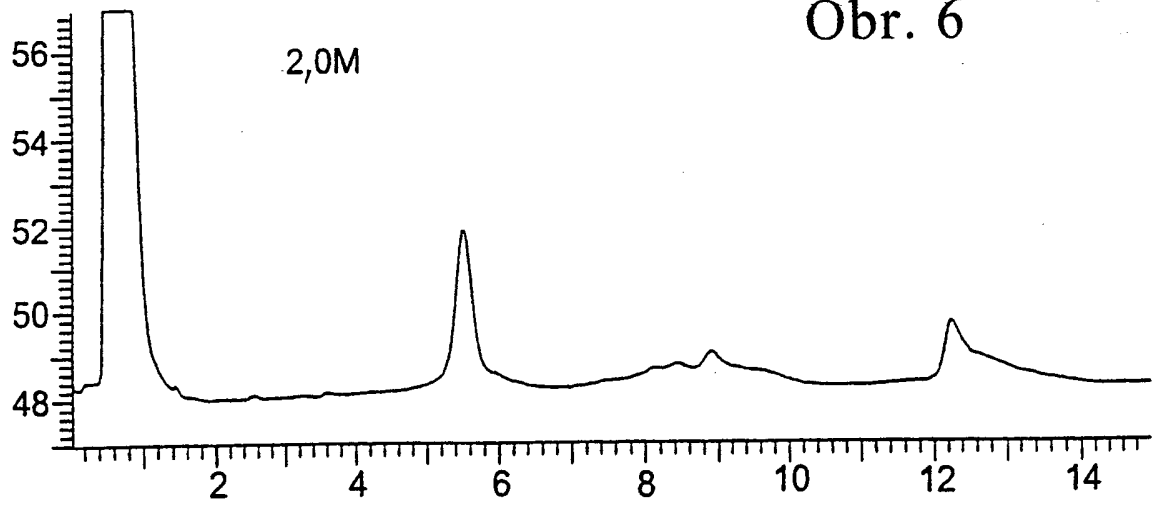


01.08.01

IV 2000-3058

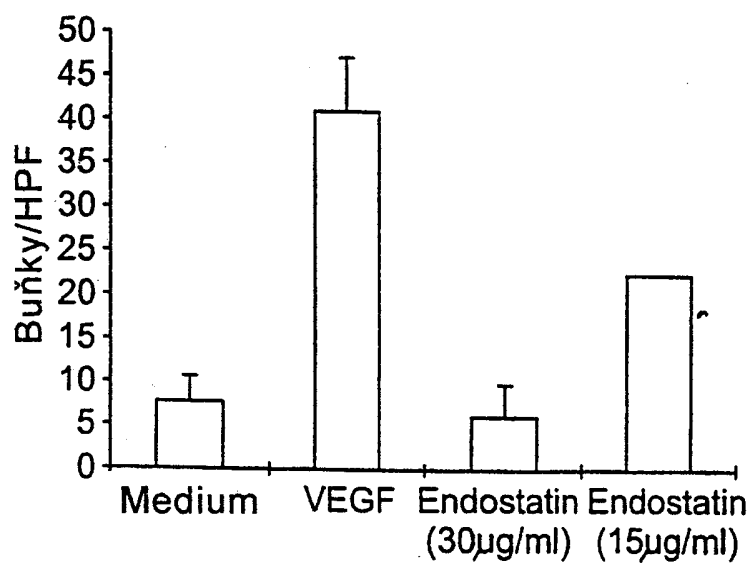
6 / 10

Obr. 6



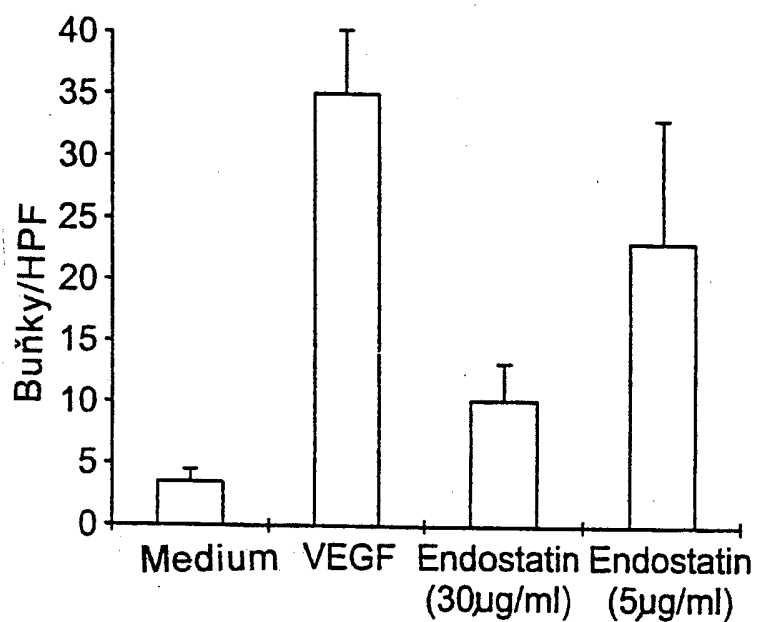
Obr. 7

Vliv endostatinu na migraci HMEC



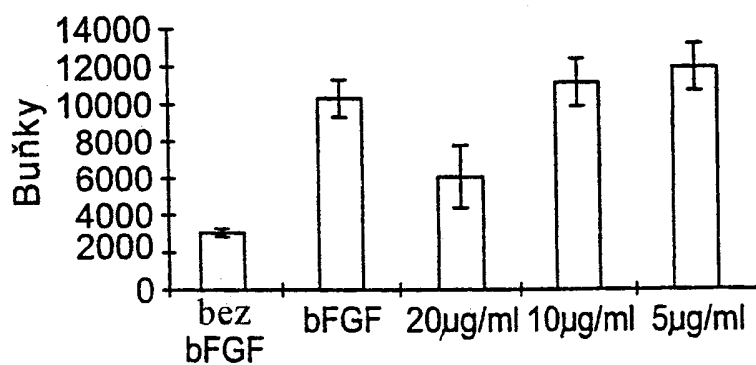
Obr. 8

Vliv endostatínu na migraci CPAE



Obr. 9

Inhibice proliferace Ba cEND buněk myším endostatinem



Obr. 10

Inhibice proliferace Ba cEND buněk lidským endostatinem

