

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235436**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410286**

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2014**

(51) Int.Cl.

C12N 9/42 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

(54) **Kompleks białkowy zawierający białko G i chitynazę A, sposób wyodrębniania z roztworu wodnego chitynazę A oraz jego zastosowania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
06.06.2016 BUP 12/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
10.08.2020 WUP 11/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

JOANNA BERETA, Kraków, PL

JAROSŁAW JUCHA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

recz. pat. Rafał Witek

PL 235436 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy wykorzystania chromatografii powinowactwa z użyciem białka G do oczyszczania chitynazy. Chitynazy to enzymy należące do dwóch konserwatywnych rodzin: 18. i 19. rodziny hydrolaz glikozydowych. Białka te występują w bardzo wielu typach organizmów począwszy od wirusów, przez bakterie, rośliny i owady aż po ssaki. Chitynazy odpowiadają za hydrolizę drugiego pod względem występowania w naturze polisacharydu – chityny, czyli polimeru składającego się z połączonych ze sobą wiązaniem β -1,4 cząsteczek N-acetyloglukozoaminy. Obecnie stosowane metody oczyszczania chitynazy składają się z kilkustopniowych procedur obejmujących m.in. chromatografię jonowymienną, sączenie molekularne lub chromatografię powinowactwa, o ile rekombinowane białko posiada dodatkowe metki fuzyjne.

Chitynazy przyciągają coraz większą uwagę z uwagi na ich potencjalne wykorzystanie w różnych gałęziach przemysłu. Perspektywa zastosowania chitynazy jako przyjaznego środowisku bioinsektycydu pozwoliłaby zastąpić powszechnie używane chemiczne pestycydy w rolnictwie. Enzym ten może zostać również wykorzystany do uzyskiwania oligosacharydów będących pochodnymi chityny. Takie związki mają potencjalne zastosowanie w przetwórstwie żywności jako naturalne konserwanty, jak również w przemyśle farmaceutycznym m.in. jako preparaty o charakterze bakterio- i grzybobójczym, a także związki o potencjale obniżania cholesterolu (pochodne chitozanu). Ze względu na obfitość występowania chityny w środowisku, zastosowanie taniej a zarazem wydajnej metody oczyszczania chitynazy jakim jest opisywany wynalazek, może umożliwić również pozyskanie nowych, alternatywnych i odnawialnych źródeł energii.

Chitynaza A to enzym o aktywności egzo- i endochitynazy, wykazujący szeroką specyficzność substratową oraz aktywny w znacznym zakresie pH. Enzym ten jest wytwarzany w komórkach zakaźnych przez wirusy z rodziny bakulowirusów (*Baculoviridae*), do której należą wirusy o pałeczkowatym kształcie i genomie zbudowanym z dwuniciowej kolistej cząsteczki DNA. Poznane dotąd bakulowirusy zakażają komórki bezkręgowców ponad 600 gatunków i wykazują bardzo specyficzny gatunkowo tropizm, pomimo dużego podobieństwa w budowie i sekwencji genomu. W szczególności sekwencja aminokwasowa chitynaz pochodzących z bakulowirusów wykazuje znaczne podobieństwo, na co wskazuje duży stopień identyczności w obrębie domeny katalitycznej oraz obecność fragmentu immunoglobulinopodobnego (ang. immunoglobulin-like fold).

Białko G to białko ściany komórek bakteryjnych pochodzące z bakterii rodzaju *Streptococcus*. Dowiedziono, że białko to oddziałuje z fragmentem Fc przeciwciał. W celu zwiększenia powinowactwa do immunoglobulin opracowano szereg modyfikacji tego białka, które są obecnie powszechnie używane do oczyszczania przeciwciał metodą chromatografii powinowactwa, zwłaszcza przeciwciał ludzkich i mysich.

Celem wynalazku jest dostarczenie metody oczyszczania chitynazy lub białek zawierających sekwencję aminokwasową pochodzącą z chitynazy.

Przedmiotem wynalazku jest kompleks białkowy zawierający białko G i związaną z nim niekovalencyjnie chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy A posiadający powinowactwo do białka G.

Chitynaza A w kontekście przedmiotowego zgłoszenia powinna być rozumiana jako białko posiadające aktywność beta-1,4-poly-N-acetylo glukozamidynazową zdolne do rozkładu polimerów chitodekstrynowych i chityny, zawierające domenę katalityczną oraz sekwencję oddziałującą z białkiem G. W korzystnej realizacji wynalazku chitynaza A zawiera fragment immunoglobulinopodobny (ang. immunoglobulin-like fold). W szczególności zgodnie z przedmiotowym wynalazkiem chitynazą A jest enzym pochodzący z *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) o sekwencji zdeponowanej jako GenBank ID: CAD79454.1 lub jego homolog, w szczególności enzym pochodzący z wirusa należącego do rodziny bakulowirusów (*Baculoviridae*).

Korzystnie kompleks białkowy według wynalazku ulega dysocjacji w roztworze wodnym o odczynie kwaśnym (pH poniżej 5), korzystnie o pH około 2, zachowując przy tym wysoką aktywność biologiczną chitynazy. Korzystnie, chitynaza pochodzi z wirusa należącego do rodziny bakulowirusów (*Baculoviridae*). W korzystnej realizacji chitynaza posiada sekwencję aminokwasową przedstawioną jako Sekw. nr 1 lub sekwencję identyczną w co najmniej 50% natomiast białko G posiada sekwencję aminokwasową przedstawioną jako Sekw. nr 3.

Poziom identyczności należy oszacować na podstawie analiz porównawczych znanych ze stanu techniki, np.: Sangar V, Blankenberg DJ, Altman N, Lesk AM. Quantitative sequence-function relationships in proteins based on gene ontology. *BMC Bioinformatics* 2007, 8:294, doi:10.1186/1471-2105-8-294.

Korzystnie, białko G jest dodatkowo immobilizowane na nośniku. W korzystnej realizacji chitynaza A lub jej fragment posiadający powinowactwo do białka G stanowi część białka fuzyjnego.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania z roztworu wodnego chitynazy A lub białka zawierającego jej fragment posiadający powinowactwo do białka G charakteryzujący się tym, że:

- a) kontaktuje się białko G z roztworem wodnym zawierającym chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego białko G i związaną z nim niekowalencyjnie chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G,
- b) oddziela się od roztworu uzyskany kompleks białkowy,
- c) z uzyskanego kompleksu białkowego oddysocjowuje się chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G,
- d) z roztworu po dysocjacji wyodrębnia się chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G.

Korzystnie w etapie a) uzyskuje się kompleks białkowy według wynalazku określony powyżej.

Korzystnie, w etapie b) wyodrębnianie prowadzi się metodą chromatografii powinowactwa, przy czym jako złożę stosuje się nośnik chromatograficzny zawierający immobilizowane białko G.

Korzystnie, dysocjację w etapie c) prowadzi się w roztworze wodnym o odczynie kwaśnym ($\text{pH} < 5$), korzystnie o $\text{pH} 2$.

W korzystnej realizacji sposobu według wynalazku w etapie d) wyodrębnia się białko fuzyjne zawierające chitynazę A lub jej fragment posiadający powinowactwo do białka G.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie zdefiniowanego powyżej sposobu według wynalazku do otrzymywania aktywnych biologicznie preparatów chitynazy A.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie zdefiniowanego powyżej sposobu według wynalazku do usuwania chitynazy A z preparatów białkowych.

Zgodnie z korzystną realizacją prezentowany sposób może służyć do oczyszczania metodą chromatograficzną na kolumnie zawierającej złożę zawierające immobilizowane białko G różnych białek, zwłaszcza białek rekombinowanych mających postać białek fuzyjnych składających się z białka docelowego oraz przyłączonej do niego sekwencji aminokwasowej pochodzącej z chitynazy A posiadającej powinowactwo do białka G.

Prezentowany sposób oczyszczania z wykorzystaniem bakteryjnego białka G cechuje się wysoką specyficznością, wydajnością i prostotą.

W celu lepszego przedstawienia prezentowanego wynalazku jego opis został uzupełniony o poniższe przykłady wykonania oraz następujące rysunki:

Fig. 1 prezentuje rozdział elektroforetyczny frakcji otrzymanych po oczyszczeniu pożywek hodowlanych z komórek owadzych zakażonych bakulowirusem. Cyframi 1–4 oznaczono numer frakcji zawierającej wyeluowane białko. Końcowa objętość frakcji to 1 ml. Na żel nałożono 25 μl każdej z frakcji. Wizualizacji białek dokonano poprzez ich wybarwienie błękitem kumazyny.

Na Fig. 2 przedstawiono wynik analizy białek metodą Western blot otrzymany po ekspozycji sygnału chemiluminescencyjnego na kliszę rentgenowską. Cyframi 1–4 oznaczono numer frakcji zawierającej wyeluowane białko. Końcowa objętość frakcji to 1 ml. Na żel nałożono 25 μl każdej z frakcji. Wizualizacji białek dokonano poprzez ich wyznakowanie przy pomocy przeciwciał anti-Fc skoniugowanych z peroksydazą chrzanową, a następnie detekcję za pomocą chemiluminescencyjnego substratu dla peroksydazy chrzanowej.

Na Fig. 3 przedstawiona została identyfikacja cukrów redukujących uwolnionych po trawieniu chitozanu chitynazą A (odczyn Fehlinga). A – chitozan poddany reakcji enzymatycznej z chitynazą A (żółto-zielone zabarwienie osadu powstałe poprzez redukcję jonów Cu^{2+} do jonów Cu^{+}). B – chitozan który nie był poddany działaniu chitynazy A (niebieskie zabarwienie osadu pochodzące od niezredukowanych jonów Cu^{2+}).

Na Fig. 4 przedstawiono wyniki pomiarów intensywności fluorescencji ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$) w zależności od czasu inkubacji enzymu z fluorogennym substratem. Legenda wykresu przedstawia różne stężenia użytej chitynazy (500 pM – 7,8 pM) przy wykorzystaniu stałej ilości substratu (7,5 μM).

Na Fig. 5 przedstawiono wynik bezpośredniego testu ELISA obrazujący wiązanie białka G do chitynaz pochodzących z różnych organizmów. Pomiaru absorbancji dokonano poprzez pomiar przy długości fali $\lambda = 450$ nm. Legenda wykresu przedstawia chitynazy pochodzące z różnych organizmów analizowane pod kątem zdolności do tworzenia kompleksu z białkiem G.

Poniższe przykłady nie powinny być jednak utożsamiane z pełnym zakresem przedmiotowego wynalazku, którego istotę określono powyżej.

P r z y k ł a d 1. Oczyszczanie chitynazy A obejmujące uzyskiwanie kompleksu z białkiem G.

Etapy procesu ekspresji i oczyszczania chitynazy A:

1. Ekspresja:
 - a) zawiesinową hodowlę komórek owadzych SF9 lub High Five™ prowadzono w pożywce ESF 921 firmy ExpressionSystems do momentu otrzymania gęstości 2 mln komórek/ml pożywki;
 - b) komórki zainfekowano bakulowirusem (MOI = 2), a następnie hodowano przez 120 godz. w temperaturze 27°C z mieszaniem (140 rpm).
2. Oczyszczanie:
 - a) hodowlę komórkową żwirowano w temperaturze 4°C przez 5 minut przy 10 000 x g;
 - b) zebrano nadsącz (pożywka pozbawiona komórek) i podwyższono pH do wartości 7,1 oraz dodano inhibitorów proteaz: PMSF (Sigma-Aldrich) oraz fenantroliny (Bioshop) do końcowego stężenia 1 mM;
 - c) preparat przesączono za pomocą filtrów o porowatości 0,45 μ m;
 - d) kolumnę chromatograficzną zawierającą immobilizowane białko G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow firmy GE Healthcare Life Sciences) zrównoważono 20 mM buforem fosforanowym o pH 7,1 (przygotowanym z odczynników firmy Bioshop) w ilości 5-krotnej objętości kolumny;
 - e) kolumnę wypełniano przygotowanym wcześniej preparatem białkowym przy prędkości przepływu 1 ml/min w temperaturze 4°C;
 - f) wypełnioną kolumnę przepłukano 20 mM buforem fosforanowym o pH 7,1 w ilości 10-krotnej objętości kolumny;
 - g) elucji białka dokonano za pomocą wodnego roztworu 0,1 M kwasu cytrynowego o pH 2,0 (Bioshop). Zbierane frakcje o objętości 0,9 ml zneutralizowano poprzez dodanie 100 μ l 2 M roztworu TRIS (Bioshop).

W trakcie oczyszczania dochodzi do niekowalencyjnego oddziaływania białka G z chitynazą A. Białko G to białko o masie ok. 21,6 kDa, natomiast masa molowa chitynazy A w przybliżeniu równa jest 65 kDa. Masa molowa powstającego kompleksu szacowana jest na ok. 87 kDa. Na Fig. 1 przedstawiono rozdział zebranych frakcji w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE (warunki redukujące) uwidocznionych błękitem kumazyny.

P r z y k ł a d 2. Identyfikacja chitynazy A oczyszczonej metodą obejmującą uzyskiwanie kompleksu z białkiem G.

Frakcje białek rozdzielone w żelu poliakryloamidowym według przykładu 1 poddano elektrotransferowi na membranę PVDF, którą następnie zablokowano roztworem 5% mleka w buforze TBS. Membranę inkubowano z roztworem przeciwciał anti-mysie IgG (specyficzne do fragmentu Fc) sprzęgniętymi z peroksydazą chrzanową przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu tego roztworu na membranę nałożono substrat chemiluminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej i dokonano ekspozycji sygnału na kliszę rentgenowską. Na Fig. 2 przedstawiono otrzymany wynik.

Aby jednoznacznie zidentyfikować otrzymane białko oznaczono fragment jego sekwencji aminokwasowej poczynając od N-końca. Analizie poddano 20 reszt aminokwasowych; uzyskano następujący wynik: IPGTP VIDWADRNY ALVEIN.

Otrzymaną sekwencję porównano z sekwencjami białek zebranych w bazie danych UniProtKB/Swiss-Prot. Analiza wykazała jednoznacznie, iż otrzymane białko to chitynaza A pochodząca z *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV).

P r z y k ł a d 3. Badanie aktywności enzymatycznej chitynazy A oczyszczonej metodą obejmującą uzyskiwanie kompleksu z białkiem G.

Za pomocą dwóch niezależnych testów wykazano, iż chitynaza oczyszczona za pomocą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem białka G jest aktywna biologicznie.

Pierwszy test wykonano poprzez oznaczenie cukrów redukujących powstałych po hydrolizie chitozanu wskutek aktywności enzymatycznej wyizolowanej chitynazy (test Fehlinga). W teście tym redukcji ulegają jony miedzi Cu^{2+} (zabarwienie niebieskie) do jonów Cu^{+} (zabarwienie żółto-zielone) pod wpływem obecności cukrów redukujących w badanej próbce (Fig. 3).

Drugim testem był pomiar fluorescencji produktu (4-metylolumbelliferonu) powstałego po enzymatycznym trawieniu substratu, który jest analogiem chityny (4-metylolumbelliferylo- β -D-N,N',N''-triace-tylochitotriozyd, MUF-triNAG), przez wyizolowaną chitynazę. Na wykresie (Fig. 4) przedstawiono zależność intensywności fluorescencji (proporcjonalnej do ilości produktu) od czasu prowadzonej reakcji. W teście wykorzystano stałe stężenie substratu ($7,5 \mu\text{M}$) oraz zmienną ilość chitynazy (od 500 pM do $7,8 \text{ pM}$). Wzbudzenie fluorescencji prowadzone było przy 360 nm , natomiast pomiaru fluorescencji dokonywano przy 455 nm przez 100 minut .

Kolejnym testem było sprawdzenie zdolności chitynaz pochodzących z: *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (enzym oczyszczony według przykładu 1), *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich), *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich) oraz rekombinowanej ludzkiej chitynazy (Sino Biological Inc.) do tworzenia kompleksów z białkiem G. W tym celu przeprowadzono bezpośredni test ELISA. Studzienki płytki do testu ELISA opłaszczono chitynazami pochodzącymi z różnych organizmów stosując roztwory białek o stężeniu $8 \mu\text{g/ml}$ w 50 mM buforze boranowym o $\text{pH } 8,3$; opłaszczanie prowadzono przez noc w temperaturze 4°C . Następnie, w celu zablokowania wolnych miejsc na powierzchni studzienek płytki, zastosowano 3% roztwór albuminy wołowej (BSA) w buforze PBS; inkubację prowadzono przez 1 godz. w temperaturze 37°C . Po tym czasie do studzienek płytki nałożono roztwór zbiotynylowanego białka G o końcowym stężeniu $1 \mu\text{g/ml}$ w $0,5\%$ roztworze BSA w buforze PBS; inkubację prowadzono przez 2 godz. w temperaturze 37°C . Niezwiązane białko G odplukano buforem PBS. Do detekcji powstałych kompleksów białka G i chitynazy wykorzystano roztwór streptawidyny sprzęgniętej z peroksydazą chrzanową (GE Healthcare) w rozcieńczeniu $1:500$ w $0,5\%$ BSA w buforze PBS; inkubacja w temperaturze 37°C trwała 45 minut . Po przepłukaniu studzienek płytki roztworem PBS dodano do nich roztwór chromogennego substratu dla peroksydazy chrzanowej, a po rozwinięciu sygnału (ok. 20 minut) reakcję zatrzymano poprzez dodanie $0,1 \text{ M}$ roztworu kwasu solnego. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$. Wynik (przedstawiony na Fig. 5) wskazał, iż tylko chitynaza A pochodząca z *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) wykazuje zdolność do tworzenia kompleksu z białkiem G.

W obrębie sekwencji aminokwasowej chitynazy A otrzymanej z AcMNPV w pozycjach 14–121 znajduje się fragment immunoglobulinopodobny (ang. immunoglobulin-like fold), którego brak w sekwencji innych badanych chitynaz. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wskazuje, że co najmniej kilkadziesiąt chitynaz wytwarzanych w różnych organizmach posiada fragment aminokwasowy, który wykazuje homologię nie mniejszą niż 50% do fragmentu immunoglobulinopodobnego chitynazy A z AcMNPV.

Powyższe przykłady wykonania dowodzą, że aktywną biologicznie chitynazę A wytwarzaną przez zakażone bakulowirusem komórki owadzie linii SF9, SF21 oraz High Five™ udaje się oczyścić poprzez wiązanie enzymu z dużym powinowactwem do białka G. Wynalazek umożliwia oczyszczanie chitynazy A, która należy do grupy enzymów stosowanych w przemyśle m.in. do ochrony roślin, a potencjalnie także jako terapeutyk grzybobójczy oraz narzędzie enzymatyczne w wielu innych dziedzinach (m.in. do otrzymywania farmaceutyków i paliw). Wynalazek pozwala na oczyszczanie enzymu, który został otrzymany za pomocą dowolnego systemu ekspresji. W szczególności oczyszczana może być chitynaza pochodząca z bakulowirusowego systemu ekspresji białek, który jest powszechnie używany do produkcji rozmaitych białek rekombinowanych. Ponieważ przy każdym procesie otrzymywania białek rekombinowanych, do którego wykorzystywany jest bakulowirusowy system ekspresyjny generowane są produkty uboczne zawierające chitynazę (lizaty komórek owadzych, frakcje po wstępnym oczyszczeniu białek itd.) możliwe jest ich dalsze wykorzystanie w celu oczyszczania chitynazy A za pomocą niniejszego wynalazku.

Z drugiej strony zastosowanie wynalazku powinno być pomocne w procedurze oczyszczania innych białek, zwłaszcza ekspresjonowanych w systemie bakulowirusowym, w celu usunięcia chitynazy A z otrzymywanych preparatów białkowych.

W świetle powyższych przykładów wykonania możliwe jest wykorzystanie fragmentu sekwencji białkowej chitynazy A jako nowego typu metki fuzyjnej, którą można zastosować jako narzędzie do oczyszczania białek rekombinowanych przy pomocy białka G.

Sposób zastosowania chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem białka G do oczyszczania chitynazy A według wynalazku jest szybki, wydajny i jednoetapowy. Ponadto wykorzystanie bezpośredniego oddziaływania chitynazy z białkiem G eliminuje konieczność wprowadzania metek w obrębie chitynazy, które mogą zaburzać funkcje białka, a ich odcięcie wiąże się z dodatkowym etapem trawienia i oczyszczania.

Literatura:

- [1] P. Jolles and R. A. A. Muzzarelli, *Chitin and Chitinases*. Springer, 1999.
- [2] N. Dahiya, R. Tewari, and G. S. Hoondal, *Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 71, no. 6, pp. 773–782, Aug. 2006.
- [3] H. Merzendorfer and L. Zimoch, *Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases*, *J. Exp. Biol.*, vol. 206, no. Pt 24, pp. 4393–4412, Dec. 2003.
- [4] R. E. Hawtin, T. Zarkowska, K. Arnold, C. J. Thomas, G. W. Gooday, L. A. Ring, J. A. Kuzio, and R. D. Possee, *Liquefaction of Autographa californica nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes*, *Virology*, vol. 238, no. 2, pp. 243–253, Nov. 1997.
- [5] K. Vega and M. Kalkum, *Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections*, *Int. J. Microbiol.*, vol. 2012, pp. 1–10, 2012.
- [6] J. E. Barboza-Corona, O. B. Gutierrez-Acosta, M. Imperial-Cervantes, D. K. Bideshi, N. de la Fuente-Salcido, M. Bautista-Justo, and R. Salcedo-Hernandez, *Generation of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in Escherichia coli*, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 5, pp. 1511–1520, Nov. 2008.
- [7] B. B. Aam, E. B. Heggset, A. L. Norberg, M. Sørli, K. M. Vårum, and V. G. H. Eijsink, *Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine*, *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 5, pp. 1482–1517, 2010.
- [8] R. Rao, L. Fiandra, B. Giordana, M. de Eguileor, T. Congiu, N. Burlini, S. Arciello, G. Corrado, and F. Pennacchio, *AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of Bombyx mori larvae*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 34, no. 11, pp. 1205–1213, Nov. 2004.
- [9] A. Di Maro, I. Terracciano, L. Sticco, L. Fiandra, M. Ruocco, G. Corrado, A. Parente, and R. Rao, *Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco*, *J. Biotechnol.*, vol. 147, no. 1, pp. 1–6, May 2010.
- [10] A. Grigorian, L. Araujo, N. N. Naidu, D. J. Place, B. Choudhury, and M. Demetriou, *N-acetylglucosamine inhibits T-helper 1 (Th1)/T-helper 17 (Th17) cell responses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis*, *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 46, pp. 40133–40141, Nov. 2011.
- [11] R. E. Hawtin, K. Arnold, M. D. Ayres, P. M. de A. Zanotto, S. C. Howard, G. W. Gooday, L. H. Chappell, P. I. A. Kitts, L. A. King, R. D. Possee, *Identification and Preliminary Characterization of a Chitinase Gene in the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome*, *Virology*, vol. 212, no. 2, pp. 673–685, Oct. 1995.
- [12] Patent US6352850B1 – Chitinase and method for preparing the same
- [13] *Zgłoszenie patentowe nr P337060 – Materiały i metody związane z chitynazą (odpowiednik zgłoszenia PCTnr WO9747752A1)*.
- [14] Björck L., Kronvall G. *Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent*. *J Immunol.* 1984 Aug; 133(2):969-74.
- [15] Lund LN1, Christensen T., Toone E., *Exploring variation in binding of Protein A and Protein G to immunoglobulin type G by isothermal titration calorimetry*. *J Mol Recognit.* 2011 Nov-Dec;24(6):945-52. doi: 10.1002/jmr.1140.
- [16] Moks T, Abrahamsén L, Nilsson B, *Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains*. *Eur J Biochem.* 1986 May 2; 156(3):637–43.
- [17] Sangar V., Blankenberg D.J., Altman N., Lesk A.M., *Quantitative sequence-function relationships in proteins based on gene ontology*, *BMC Bioinformatics* 2007, 8:294, doi: 10.1186/1471-2105-8-294.

Wykaz sekwencji

Sekw. nr 1

MLYKLLNVLWLVAVSNAIPGTPVIDWADRNYALVEINYEATAYENLIKPKEQVDVQVSWNVWNGDIGD
IAYVLFDEQQVWKGDAESKRATIKVLVSGQFNMRVKLCNEDGCSVSDPVLVKVADTDGGHLAPLEYTW
LENNKPGRRREDKIVAAYFVEWGVYGRNFPVDKVPPLNLSHLLYGFIPICGGDGINDALKTISGSFESL
QRSCKGREDFKVAIHDPWAAVQKPKQKSVSAWNEPYKGNFGQLMAAKLANPHLKILPSIGGWTLSDPFY
FMHDVEKRNVPVDSVKEFLQVWKFFDGDVDVDWEFPGGKGANPSLGDAERDAKTYILLLEELRAMLDDL
EAQTGRVYELTSAISAGYDKIAVVNYAEAQKSLGKIFLMSYDFKGAWSNTDLGYQTTVYAPSWNSEEL
YTTHYAVDALLKQGVDPNKIIIVGVAMYGRGWTCTVNTNYTNDNYFSGTGNGPVSQGTWEDGVVDYRQIQKD
LNNVYVTFDSAAQASYVFDKSKGDLISFDSVDSVLGKVYVDRNKLGGGLFAWEIDADNGDLLNAINAQ
FKPKDEL

Chitinase [Autographa californica nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)],
GenBank: CAD79454.1,

Sekw. nr 2

AIPGTPVIDWADRNYALVEINYEATAYENLIKPKEQVDVQVSWNVWNGDIGDIAYVLFDEQQVWKGDA
ESKRATIKVLVSGQFNMRVKLCNEDGCSVSDPVLVKV

Immunoglobulin-like fold (17-121) from Chitinase [Autographa
californica nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)], GenBank: CAD79454.1,

Sekw. nr 3

MEKEKKVKYFLRKSAGFLASVSAAFLVGSTVFAVDSPIEDTPIIRNGGELTNLLGNSETT
LALRNEESATADLTAAAVADTVAAAAAENAGAAAWEAAAAADALAKAKADALKEFNKYGV
SDYYKNLINNAKTVEGVKDLQAQVVESAKKARISEATDGLSDFLKSQTPAEDTVKSIELA
EAKVLANRELDKYGVSDYHKNLINNAKTVEGVKDLQAQVVESAKKARISEATDGLSDFLK
SQTPAEDTVKSIELAEAKVLANRELDKYGVSDYKKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPK
TDTYKLIILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEKPE
VIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDAT
KTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGV
DGVWTYDDATKTFTVTEMVTEVPGDAPTEPEKPEASIPLVPLTPATPIAKDDAKKDDTKK
EDAKKPEAKKEDAKKAETLPTTGEKSNPFFTAALAVMAGAGALAVASKRKED

Immunoglobulin G-binding protein G [Streptococcus sp. GX7805],
GenBank: CAA68489.1

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompleks białkowy zawierający białko G i związaną z nim niekowalencyjnie chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy A posiadający powinowactwo do białka G.
2. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ulega on dysocjacji w roztworze wodnym o odczynie kwaśnym (pH<5), korzystnie o pH 2.
3. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że chitynaza pochodzi z wirusa należącego do rodziny bakulowirusów (Baculoviridae).
4. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że chitynaza posiada sekwencję aminokwasową przedstawioną jako Sekw. nr 1 lub sekwencję identyczną w co najmniej 50%.

5. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że chitynaza zawiera fragment immunoglobulinopodobny (ang. immunoglobulin-like fold).
6. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że chitynaza zawiera domenę o sekwencji aminokwasowej przedstawionej jako Sekw. nr 2 lub sekwencji identycznej w co najmniej 50%.
7. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że białko G posiada sekwencję aminokwasową przedstawioną jako Sekw. nr 3.
8. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że białko G jest dodatkowo immobilizowane na nośniku.
9. Kompleks według zastrz. 1, **znamienny tym**, że chitynaza A lub jej fragment posiadający powinowactwo do białka G stanowi część białka fuzyjnego.
10. Sposób wyodrębniania z roztworu wodnego chitynazy A lub białka zawierającego jej fragment posiadający powinowactwo do białka G, **znamienny tym**, że:
 - a) kontaktuje się białko G z roztworem wodnym zawierającym chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego białko G i związaną z nim niekowalencyjnie chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G,
 - b) oddziela się od roztworu uzyskany kompleks białkowy,
 - c) z uzyskanego kompleksu białkowego oddysocjowuje się chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G,
 - d) z roztworu po dysocjacji wyodrębnia się chitynazę A lub białko zawierające fragment chitynazy posiadający powinowactwo do białka G.
11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że w etapie a) uzyskuje się kompleks białkowy określony w zastrz. 1–6.
12. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że w etapie b) wyodrębnianie prowadzi się metodą chromatografii powinowactwa, przy czym jako złożę stosuje się nośnik chromatograficzny zawierający immobilizowane białko G.
13. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że dysocjację w etapie c) prowadzi się w roztworze wodnym o odczynie kwaśnym ($\text{pH} < 5$), korzystnie o $\text{pH} 2$.
14. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że w etapie d) wyodrębnia się białko fuzyjne zawierające chitynazę A lub jej fragment posiadający powinowactwo do białka G.
15. Zastosowanie sposobu jak określono w zastrz. 10 do otrzymywania aktywnych biologicznie preparatów chitynazy A.
16. Zastosowanie sposobu jak określono w zastrz. 10 do usuwania chitynazy A z preparatów białkowych.

Rysunki

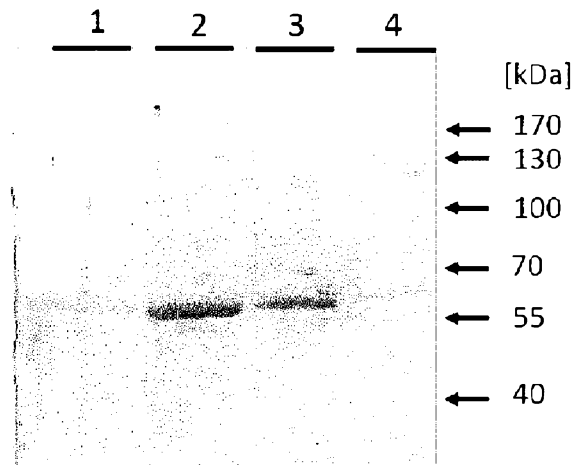


Fig. 1

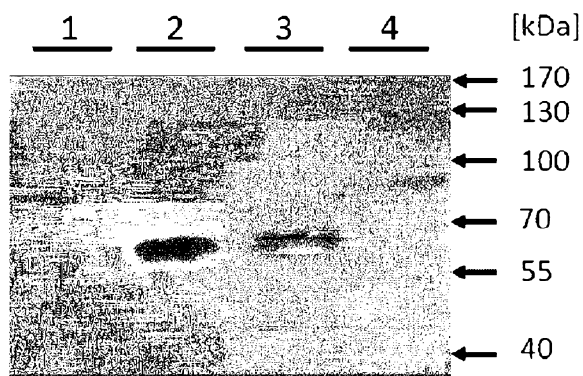


Fig. 2

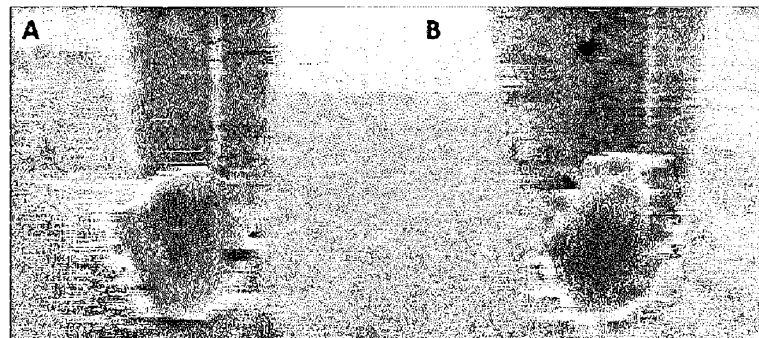


Fig. 3

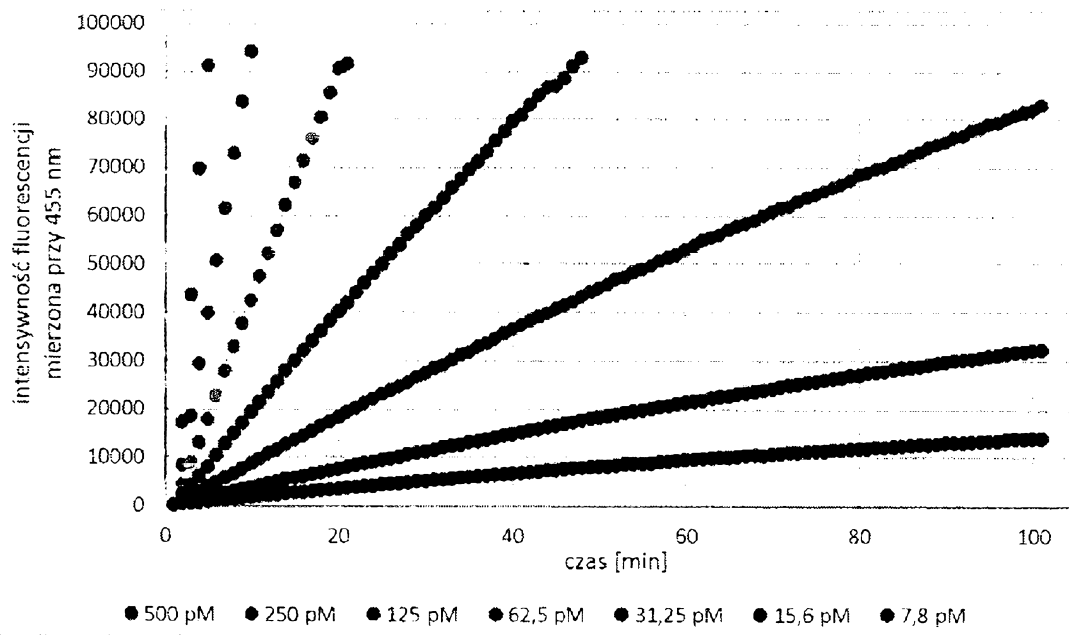


Fig. 4

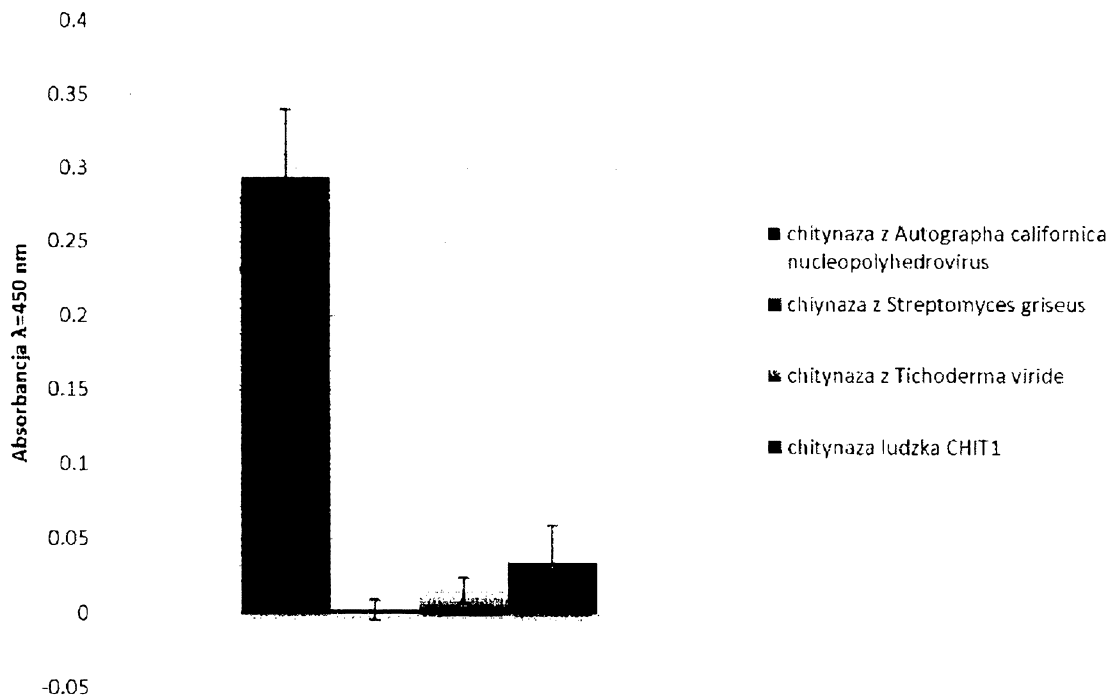


Fig. 5