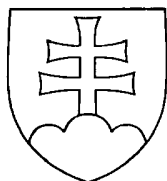


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 08.04.96  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/419 787  
(32) Dátum priority: 11.04.95  
(33) Krajina priority: US  
(40) Dátum zverejnenia: 08.07.98  
(86) Číslo PCT: PCT/US96/04794, 08.04.96

(21) Číslo dokumentu:

# 1381-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> :

C 12N 15/12,  
C 12N 15/29,  
C 07K 5/062,  
C 07K 5/068,  
C 07K 5/06

(71) Prihlasovateľ: Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Borneman W. Scott, Rahway, NJ, US;  
Goyal Anil, Rahway, NJ, US;  
Conder Michael J., Rahway, NJ, US;  
Vinci Victor A., Rahway, NJ, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob prípravy dipeptidového medziproduktu**

(57) Anotácia:  
Spôsob prípravy dipeptidového medziproduktu, ktorý zahŕňa prípravu rekombinantného polypeptidu, ktorý obsahuje dipeptidový medziprodukt. Dipeptidový medziprodukt je ďalej spracovávaný s cieľom získať konečný produkt.

## Spôsob prípravy dipeptidového medziproduktu

### Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu prípravy dipeptidového medziproduktu zlúčeniny, založenej na dipeptide.

### Doterajší stav techniky

Priemyselná príprava zlúčenín, ktoré sú založené aspoň sčasti na dipeptidových medziproduktoch vyžaduje okamžitú dostupnosť veľkého množstva dipeptidových medziproduktov za nízke ceny. Za týmto účelom možno pripraviť dipeptidy prakticky akýchkoľvek aminokyselín, avšak syntéza dipeptidu môže byť časovo náročná a nákladná, čo znižuje efektívnosť prípravy produktu a zvyšuje náklady výroby. Tieto nevýhody sú zvlášť dôležité pri masovej priemyselnej výrobe zlúčenín založených na dipeptidových medziproduktoch.

### Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvorí spôsob prípravy zlúčenín založených na báze dipeptidových medziproduktov. Zlúčeniny založené na dipeptidových medziproduktoch sú pripravované postupmi rekombinantnej DNA a pripravujú sa zo syntetickej sekvencie DNA alebo z prirodzene sa vyskytujúcej sekvencie DNA, z ktorých obe kódujú proteín alebo peptid so špecifickou opakujúcou sa dipeptidovou sekvenciou. Dipeptidové medziprodukty sa enzymaticky uvoľňujú z väčšieho proteínu alebo peptidu a ďalej sa spracovávajú s cieľom získať konečný produkt.

Tento vynález sa týka spôsobu prípravy zlúčenín založených na dipeptidových medziproduktoch. Tieto intermediárne zlúčeniny môžu byť ďalej spracovávané, aby sa získala konečná zlúčenina. Dipeptidové medziprodukty sa pripravujú v rekombinantných hostiteľských bunkách exprimovaním rekomb-

binantnej molekuly DNA, ktorá kóduje aspoň jeden dipeptidový medziprodukt. Rekombinantná molekula DNA môže byť buď syntetická molekula DNA alebo prirodzene sa vyskytujúca sekvencia DNA. DNA kódujúca dipeptid sa klonuje do exprimačného vektora na exprimovanie v rekombinantnej hostiteľskej bunke. Po exprimovaní v rekombinantnom hostiteľovi sa dipeptid purifikuje na ďalšie spracovanie. Môže sa stať, že pred purifikáciou bude potrebné dipeptid od väčšieho polypeptidu odseparovať. Väčší polypeptid obsahujúci dipeptidový medziprodukt môže pozostávať z mnohonásobne opakovanej sekvencie dipeptidu, alebo dipeptid môže byť prítomný v jednej alebo viacerých kópiách ako súčasť väčšieho proteínu obsahujúceho aminokyselinové sekvencie, ktoré nie sú dipeptidovou sekvenciou. Opakujúce sa dipeptidové sekvencie možno odseparovať do jednotlivých dipeptidov enzymatickým alebo chemickým štiepením. Jednotlivé dipeptidy možno potom čistiť na ďalšie spracovanie.

Rekombinantné hostiteľské bunky používané na prípravu dipeptidu môžu byť akékoľvek hostiteľské bunky, ktoré sú schopné exprimovať molekuly rekombinantnej DNA. Pre tých, ktorí sú zbehlí v problematike, je hneď zrejmé, že prakticky akýkoľvek rekombinantný hostiteľ je vhodný na použitie pri realizácii tohto vynálezu. Výhodné bunky zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na bunky baktérií a plesní vrátane kvasiniek. Bakteriálne a plesňové hostiteľské bunky, ktoré sú vhodné na použitie v tomto vynáleze, sú komerčne dostupné a zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces lividans* a *Bacillus subtilis*.

Pre tých, ktorí sú v problematike zbehlí, je zrejmé aj to, že exprimačným vektorom na exprimovanie DNA kódujúcej dipeptid môže byť prakticky akýkoľvek exprimačný vektor vhodný na použitie vo zvolenej hostiteľskej bunke. Výhodné vektory zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na tie, ktoré sú vhodné na použitie v bunkách baktérií a plesní vrátane kvasiniek. Bakteriálne a plesňové exprimačné vektory, ktoré sú vhodné na použitie v tomto vynáleze a sú komerčne dostupné, zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na tie, ktoré sú tu uvedené.

Odseparovanie dipeptidu od ostatných nedipeptidových sekvencií, alebo odseparovanie jednotlivých dipeptidov od opakujúcich sa dipeptidov sa uskutoč-

ňuje enzymaticky pomocou enzýmu, ktorý štiepi polypeptid v príslušnej polohe bez deštrukcie dipeptidového medziproduktu. Enzýmy vhodné na použitie v postupe tohto vynálezu môžu byť tie, ktoré sú komerčne dostupné alebo sú produkované nejakým organizmom s príslušnou enzymatickou aktivitou. Výber vhodného enzýmu bude závisieť od konkrétnej exprimovanej dipeptidovej sekvencie.

Dipeptid sa môže čistiť buď pred alebo po odseparovaní od zvyšku polypeptidu alebo od opakujúceho sa dipeptidu. Štandardné chromatografické spôsoby sú vhodné na použitie v postupe tohto vynálezu na čistenie jednotlivých dipeptidov alebo polypeptidu obsahujúceho dipeptid. Takéto štandardné chromatografické spôsoby zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na frakcionáciu solí, ionexovú chromatografiu, veľkostnú vylučovaciu chromatografiu, hydroxylapatitovú adsorpčnú chromatografiu, a hydrofóbnú interaktívnu chromatografiu.

Klonovaná DNA získaná tu opísanými spôsobmi sa môže rekombinantne exprimovať molekulovým klonovaním do exprimačného vektora obsahujúceho vhodný promótor a iné vhodné transkripčné regulačné elementy, a preniesť sa do prokaryontných alebo eukaryontných hostiteľských buniek s cieľom vytvoriť rekombinantný peptid. Postupy na takéto manipulácie sú plne opísané v publikácii Sambrook, J., *et al.*, *supra*, a sú v tejto problematike dobre známe.

Exprimačné vektory sú tu definované ako DNA sekvencie, ktoré sú potrebné pre transkripciu klonovaných kópií génov a pre transláciu ich molekúl mRNA vo vhodnom hostiteľovi. Také vektory môžu byť použité na exprimovanie eukaryontných génov v celej paleta hostiteľov ako sú napríklad baktérie, sinice, rastlinné bunky, hmyzie bunky, bunky plesní a živočíšne bunky.

Špeciálne skonštruované vektory umožňujú pendlovanie DNA medzi hostiteľmi ako sú baktérie - kvasinky alebo baktérie - živočíšne bunky alebo baktérie - plesňové bunky alebo baktérie - bunky bezstavovcov. Vhodne skonštruovaný exprimačný vektor by mal obsahovať počiatok replikácie na autonómnu replikáciu v hostiteľských bunkách, voliteľné markery, obmedzený počet užitočných miest pre restriktčné enzýmy, potenciál pre vysoký počet kópií, a aktívne klony. Promótor sa definuje ako sekvencia DNA, ktorá nariaďuje RNA polymeráze viazať sa k DNA a zahájiť syntézu RNA. Silný promótor je taký, ktorý

spôsobuje, že molekuly mRNA sú iniciované vo vysokej frekvencii. Exprimačné vektory môžu zahŕňať, no neobmedzujú sa iba na klonovacie vektory, modifikované klonovacie vektory, špeciálne skonštruované plazmidy alebo vírusy.

Na exprimovanie rekombinantného peptidu v cicavčích bunkách možno použiť rôzne cicavčie exprimačné vektory. Komerčne dostupné cicavčie exprimačné vektory, ktoré môžu byť vhodné na exprimovanie rekombinantného peptidu, zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSV gpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460), a ZD35 (ATCC 37565).

Na exprimovanie rekombinantného peptidu v bakteriálnych bunkách možno použiť rôzne bakteriálne exprimačné vektory. Komerčne dostupné bakteriálne exprimačné vektory, ktoré môžu byť vhodné na exprimovanie rekombinantného peptidu, zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na pET11a (Novagen), lambda gt11 (Invitrogen), pcDNAII (Invitrogen), pKK223-3 (Pharmacia).

Na exprimovanie rekombinantného peptidu v plesňových bunkách možno použiť rôzne exprimačné vektory plesňových buniek. Komerčne dostupné plesňové exprimačné vektory, ktoré môžu byť vhodné na exprimovanie rekombinantného peptidu, zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na pYES2 (Invitrogen), exprimačný vektor *Pichia* (Invitrogen).

Na exprimovanie rekombinantného peptidu v hmyzích bunkách možno použiť rôzne exprimačné vektory hmyzích buniek. Komerčne dostupné hmyzie exprimačné vektory, ktoré môžu byť vhodné na rekombinantné exprimovanie peptidu zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na pBlue Bac III (Invitrogen).

Exprimačný vektor obsahujúci DNA kódujúcu dipeptidový medziprodukt možno použiť na exprimovanie peptidu v rekombinantnej hostiteľskej bunke. Rekombinantné hostiteľské bunky môžu byť prokaryotické alebo eukaryotické, vrátane baktérie, no neobmedzujú sa iba na baktérie, ako je napríklad *E. coli*, bunky plesní ako sú kvasinky, cicavčie bunky zahŕňajúce, no neobmedzujú sa iba línie ľudského, hovädzieho, prasačieho, opičieho a hlodavčieho pôvodu, a

hmyzie bunky zahŕňajúce, no neobmedzujúce sa iba na bunkové línie odvodené z octomilky (*Drosophila*) a priadky morušovej. Bunkové línie odvodené z cicavčích druhov, ktoré môžu byť vhodné a ktoré sú komerčne dostupné, zahŕňajú, no neobmedzujú sa iba na L bunky L-M(TK-) (ATCC CCL 1.3), L bunky L-M (ATCC CCL 1.2), 293 (ATCC CRL 1573), Raji (ATCC CCL 86), CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) a MRC-5 (ATCC CCL 171).

Exprimačný vektor môže byť zavedený do hostiteľských buniek pomocou ktoréhokoľvek z množstva postupov vrátane, no neobmedzujúc sa iba na transformáciu, transfekciu, lipofekciu, fúziu protoplastov a elektroporáciu. Bunky obsahujúce exprimačný vektor sa klonovaním namnožia a jednotlivo sa analyzujú, aby sa určilo, či produkujú proteín. Identifikovanie klonov hostiteľských buniek exprimujúcich peptid sa môže uskutočniť niekoľkými spôsobmi vrátane, no neobmedzujúc sa iba na imunologickú reaktivitu s protilátkami proti peptidu, a prítomnosť B<sub>1</sub> aktivity spojenej s hostiteľskými bunkami, ako je napríklad väzba peptid-špecifického ligandu alebo signálna transdukcia definovaná ako odpoveď sprostredkovaná interakciou B<sub>1</sub>-špecifických ligandov na receptore.

Exprimovanie DNA sa môže uskutočniť aj pomocou *in vitro* vytvorenej syntetickej mRNA alebo natívnej mRNA. Syntetická mRNA alebo mRNA izolovaná z buniek produkujúcich peptid môže byť účinne translatovaná v rôznych bezbunkových systémoch vrátane, no neobmedzujúc sa na extrakty z pšeničných klíčkov a extrakty z retikulocytov, ako aj môže byť účinne translatovaná v bunkových systémoch vrátane, no neobmedzujúc sa na mikroinjekcie do žabích oocytov, pričom výhodné sú mikroinjekcie do žabích oocytov.

Na zistenie sekvencie (sekvencií) DNA, ktorá dáva optimálne hladiny proteínu, vrátane molekuly DNA zahŕňajúc, no neobmedzujúc sa iba na ne, možno skonštruovať nasledovné: otvorený čítací rámec (reading frame) DNA v plnej dĺžke a niekoľko konštrukcií obsahujúcich časti DNA kódujúce proteín.

Hladiny exprimovania proteínu možno stanoviť po zavedení, buď jednotlivo alebo v kombinácii, týchto konštrukcií do vhodných hostiteľských buniek. Po

stanovení DNA kazety dávajúcej optimálne exprimovanie, napríklad v prechodných postupoch, táto DNA konštrukcia sa prenesie do rôznych exprimačných vektorov na exprimovanie v hostiteľských bunkách vrátane, no neobmedzujúc sa iba na cicavčie bunky, hmyzie bunky, *E. coli*, a bunky kvasiniek ako je napríklad *S. cerevisiae*.

Transfekované hostiteľské bunky a mikroinjikované oocyty sa môžu otestovať na množstvo proteínov nasledovnými postupmi. Po uplynutí dostatočného času na umožnenie expresie, stanoví sa množstvo peptidov. Jeden zo spôsobov na stanovenie peptidov zahŕňa priame meranie množstva peptidov v celých bunkách alebo bunkových lyzátoch pripravených z hostiteľských buniek transfekovaných s DNA.

Dipeptid alanyl–prolín, Ala–Pro, je východzí materiál pre syntézu ACE inhibítora enalaprilu. Dipeptid Lys–Pro je východzím materiálom pre syntézu ACE inhibítora lysinoprilu. Komerčne dostupný dipeptid sa bežne chemicky syntetizuje. Bol vyvinutý nový bioproces, ktorý úspešne eliminuje potrebu chemických postupov na prípravu Ala–Pro alebo Lys–Pro. V postupe sa používa rekombinantný hostiteľ na nadbytočné exprimovanie peptidu obsahujúceho opakujúce sa sekvencie dipeptidu Ala–Pro alebo Lys–Pro, ktorý sa potom hydrolyzuje na zložky Ala–Pro alebo Lys–Pro pomocou bakteriálnych prolylpeptidáz. *Escherichia coli* bola zvolená ako hostiteľ kvôli dostupnosti exprimačných vektorov. Chemicky syntetizovaný oligonukleotid, ktorý kóduje opakujúce sa sekvencie Ala–Pro a vhodné miesta pre ligáciu, sa naklonoval do komerčne dostupného exprimačného vektora pMAL. Výsledkom fermentácie rekombinantnej *E. coli* obsahujúcej túto konštrukciu bol požadovaný fúzny produkt ako to bolo stanovené proteínovými gélmami. Potom sa použilo enzymatické spracovanie na uvoľnenie jednotiek Ala–Pro. Použil sa komerčne dostupný faktor X na uvoľnenie peptidu (Ala–Pro)<sub>n-20</sub>, aj keď sa mohli použiť tak isto aj prolylpeptidázy. Predbežné skríňovanie na prolylpeptidázy viedlo k zisteniu kmeňov *Lactobacillus helveticus* a *Xanthomonas maltophilia*, ktoré mali aktivitu proti substrátu Ala–Pro–pNA a syntetickému (Ala–Pro)<sub>n</sub>. Zistilo sa, že surové extrakty z každej kultúry úspešne spracúvajú (Ala–Pro)<sub>n-20</sub> na Ala–Pro, ako sa to stanovilo pomocou HPLC analýzy. Ak sa extrakty z oboch kultúr skombinovali, bol pozorovaný synergický účinok. Predpokladalo sa,

kultúr skombinovali, bol pozorovaný synergický účinok. Predpokladalo sa, že prolylpeptidázová aktivita z *L. helveticus* bola zapríčinená exopeptidázovou aktivitou, na rozdiel od endopeptidázovej aktivity zistenej u *X. maltophilia*. Opísaný bioproces má tú výhodu, že sa v ňom nepoužívajú toxické materiály používané v chemickej syntéze, a dá sa prispôbiť aj pre iné peptidy.

Po exprimovaní dipeptidového medziproduktu v rekombinantnej hostiteľskej bunke, rekombinantný proteín možno vyťažiť s cieľom získať dipeptidový medziprodukt v čistej podobe. Je známych a vhodných niekoľko purifikačných postupov. Ako to tu bolo opísané, rekombinantné dipeptidové medziprodukty možno purifikovať z bunkových lyzátov a extraktov rôznymi kombináciami alebo individuálnou frakciáciou solí, ionexovou chromatografiou, veľkostnou vylučovacou chromatografiou, hydroxylapatitovou adsorpčnou chromatografiou a hydrofóbnou interaktívnou chromatografiou.

Po čistení dipeptidového medziproduktu jedným alebo viacerými z horeuvedených spôsobov, a spôsobmi, ktoré sú známe osobám oboznámenými s problematikou purifikácie peptidov, sa dipeptidové medziprodukty ďalej spracujú na finálny produkt. V prípade dipeptidového medziproduktu Ala-Pro sa ďalšie spracovanie na finálny produkt známy ako enalapril a príbuzné zlúčeniny uskutočňuje ako to bolo opísané v patentoch U. S. Patent No. 4,374,829 a U. S. Patent No. 4,555,502; oba sú tu začlenené ako referenčné patenty pre tento účel. V prípade dipeptidového medziproduktu Lys-Pro sa ďalšie spracovanie na finálny produkt známy ako lisinopril a príbuzné zlúčeniny uskutočňuje ako to bolo opísané v patentoch U. S. Patent No. 4,374,829 a U. S. Patent No. 4,555,502; oba sú tu začlenené ako referenčné patenty pre tento účel.

Nasledujúce príklady sa uvádzajú na ilustrovanie súčasného vynálezu avšak bez jeho akéhokoľvek obmedzovania.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

#### Príklad 1

### Zostavenie vektora na exprimovanie dipeptidu

Na zostavenie vektora exprimujúceho sekvencie DNA alebo opakujúcich sa sekvencií dipeptidu sa môže zvoliť plazmid. Zvolený vektor bude obsahovať štart replikácie pre daného hostiteľa; alebo vektor môže obsahovať štarty na exprimovanie vo viacerých rodoch a bude potom fungovať ako striedavý vektor. Plazmid musí obsahovať gény pre rezistenciu voči antibiotikám a/alebo auxotrofné markery, aby sa dalo overiť, že transformácia alebo vstup vektora do bunky sa uskutočnil, a aby sa selektívnymi tlakmi udržala stabilita vektora. Silný promótor, ako je napríklad promótor *tac*, ktorý je indukovateľný, umožní maximálnu expresiu príslušného downstream génu (génov). Zahrnie sa aj dohodnuté väzbové miesto ribozómu a špecificky sa rozpozná výhodným hostiteľom. Môžu sa zahrnúť aj terminačné sekvencie downstream transkripcie a stop kodóny, aby sa zaistila správna dĺžka rekombinantného peptidu.

Podobne, fúzny proteín môže byť zakódovaný v exprimačnom vektore. Daný vektor bude kódovať skrátenejší peptid, ktorý sa vo všeobecnosti značne exprimuje vo výhodnom hostiteľovi zo svojho natívneho promótoru alebo iného silného promótoru. Klonovacie miesta pre gén alebo oligonukleotid kódujúci dipeptidový medziprodukt, ako je napríklad opakovaná sekvencia Ala-Pro alebo Lys-Pro sa môžu vytvoriť syntetickými postupmi, alebo môžu byť na mieste na základe 5' alebo 3' DNA sekvencií opakovaných úsekov. Výsledná DNA konštrukcia v prípade expsie dáva proteín obsahujúci skrátenejší enzým alebo väzbový proteín ako je proteín viažúci maltózu z *E. coli* sfúzovaný so sekvenciou dipeptidového medziproduktu. Odseparovanie možno urobiť ľahko, využívajúc k tomu fúzny partner, a následný postup odstráni 5' peptid. U niektorých hostiteľov možno použiť na sekretovanie požadovaného produktu signálne alebo líder peptidy, aby sa umožnil mimobunkový prenos.

V hostiteľskom organizme možno zmanipulovať kodónové preferencie, aby sa zvýšila expresia. Používanie kodónov vo všeobecnosti nebude v hostiteľskej bunke náhodné, nakoľko počas expsie špecifických génov sa prednostne používa jeden alebo viacero kodónov. Silne exprimované gény s vyšším výťažkom proteínov alebo peptidov sú typicky kódované kodónmi, ktoré sú uprednostňované

alebo používané častejšie ako iné. U *E. coli* sú pre lyzín k dispozícii dva kodóny, a to AAA a AAG; štyri kodóny sú možné pre prolín, a to CCA, CCC, CCG a CCU. Kodónová sekvencia CCG je častejšie používaným kodónom, a tak reziduá Pro v syntetickom oligonukleotide Lys–Pro by sa navrhli ako CCG. Lys je kódovaný iba dvomi kodónmi bez výraznej preferencie, preto ako AAA, tak aj AAG by sa mohli zvoliť ak by sa navrhoval oligonukleotid, ktorý sa stane opakovanou sekvenciou Lys–Pro exprimovanou ako polypeptid Lys–Pro. Pre oligonukleotid Ala–Pro sú zvýhodňovanými kodónovými sekvenciami GCT a GCA a boli by tak volené pre maximálnu expresiu u *E. coli*.

## Príklad 2

### Naklonovanie DNA do exprimačných vektorov v *E. coli*

Rekombinantný peptid je produkovaný v *E. coli* po prenose exprimačnej kazety peptidu do exprimačných vektorov *E. coli* včítane, no bez obmedzenia iba na sériu pET (Novagen). Vektory pET dávajú expresiou peptidu pod kontrolu pevne regulovaného promótoru bakteriofágu T7. Po prenose tejto konštrukcie do hostiteľa *E. coli*, ktorý obsahuje jednu chromozómovú kópiu génu RNA polymerázy bakteriofágu T7 riadenú indukovateľným lac promótorom, expresia peptidu sa indukuje ak sa do kultúry pridá vhodný lac substrát (IPTG). Hladiny exprimovaného peptidu sa stanovujú pomocou postupov, ktoré sú tu opísané.

cDNA kódujúca celý otvorený čítací rámec pre peptid sa vsunie na miesto NdeI vektora pET 11a. Konštrukcie v pozitívnej orientácii sa určujú sekvenčnou analýzou a používajú sa na transformáciu exprimačného hostiteľského kmeňa BL21. Transformanty sa potom použijú na inokulovanie kultúr na produkovanie proteínov. Kultúry možno pestovať v médiu M9 alebo ZB, ktorých zloženie je pre tých, ktorí v tejto problematike pracujú, známe. Po rozrastení sa kultúry až na hodnotu  $OB_{600} = 1,5$  sa exprimovanie peptidu indukuje pomocou 1 mM IPTG po dobu 3 hodín pri 37°C.

### Príklad 3

#### Naklonovanie DNA do vektora na exprimovanie v hmyzích bunkách

Vektory bakulovírusov, ktoré sú odvodené z genómu vírusu AcNPV, sú určené na zabezpečenie vysokej hladiny exprimovania cDNA v línii Sf9 hmyzích buniek (ATCC CRL# 1711). Rekombinantné bakulovírusy exprimujúce DNA, ktorá kóduje dipeptidový medziprodukt, sú produkované nasledovnými štandardnými metódami (In Vitrogen Maxbac Manual): DNA konštrukcie sú pospájané do génu polyhedrínu v celom rade bakulovírusových prenosných vektorov včítane vektorov pAC360 a BlueBac (In Vitrogen). Rekombinantné bakulovírusy sa vytvárajú homologickou rekombináciou po kotransfekcii bakulovírusového prenosného vektora a linearizovanej genómovej DNA AcNPV [Kitts, P. A., *Nuc. Acid. Res.* 18, 5667 (1990)] do buniek Sf9. Rekombinantné pAC360 vírusy sa zisťujú neprítomnosťou inklúzných teliesok v infikovaných bunkách, a rekombinantné pBlueBac vírusy sa zisťujú na základe expresie  $\beta$ -galaktozidázy (Summers, M. D. a Smith, G. E., Texas Agriculture Exp. Station Bulletin No. 1555). Po vyčistení plakov sa exprimovanie peptidu meria pomocou dvoch postupov, ktoré sú tu opísané.

cDNA kódujúca celý otvorený čítací rámec pre peptid sa vsunie na miesto BamHI vektora pBlueBacII. Konštrukcie v pozitívnej orientácii sa zisťujú sekvenčnou analýzou a použijú sa na transfekciu buniek Sf9 v prítomnosti lineárnej AcNPV DNA divého typu.

Autentický peptid sa nachádza v spojení s infikovanými bunkami. Peptid sa z infikovaných buniek vyextrahuje hypotonickou lýzou alebo pomocou detergentu. Podobne, peptid sa exprimuje v bunkovej línii Schneider 2 (*Drosophila*) kotransfekciou Schneider 2 buniek s vektorom obsahujúcim peptid DNA downstream a za kontroly indukovateľného metalotionínového promótoru, a vektora kódujúceho gén G418 ktorý je rezistentný voči neomycínu. Kultiváciou

v prítomnosti génu G418 sa získajú rezistentné bunky a indukujú sa k exprimovaniu peptidu pridaním  $\text{CuSO}_4$ .

#### Príklad 4

#### Naklonovanie DNA do exprimačného vektora kvasiniek

Rekombinantný peptid sa produkuje v kvasinkách *S. cerevisiae* po vsunutí optimálneho DNA cistrónu do exprimačných vektorov určených na riadenie vnútrobunkovej alebo mimobunkovej expresie heterológnych proteínov. V prípade vnútrobunkovej expresie, vektory ako napríklad EmBLYex4 a pod. sa pripoja k cistrónu [Rinas, U. *et al.*, *Biotechnology* 8, 543–545 (1990); Horowitz B. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265, 4189–4192 (1989)]. V prípade mimobunkovej expresie sa cistrón pripojí ku kvasinkovým exprimačným vektorom, ktoré fúzujú sekrečný signál. Hladiny exprimovaného peptidu sa stanovujú pomocou postupov, ktoré sú tu opísané.

#### Príklad 5

#### Čistenie rekombinantného peptidu

Peptid vytvorený rekombináciou môže byť čistený protilátkovou afinitnou chromatografiou.

Peptidové protilátkové afinitné kolóny sa zostavia pridaním protilátok proti peptidu k Affigelu–10 (Biorad), čo je gélová podpora, ktorá je predom aktivovaná esterami N–hydroxysukcinimidu tak, aby protilátky vytvorili kovalentné väzby s guľčkovou podporou z agarózového gélu. Protilátky sa potom pripoja ku gélu cez amidové väzby s distančným ramenom. Zostávajúce aktivované estery sa potom odaktivujú pomocou 1 M etanolamínu HCl (pH 8). Kolóna sa premyje s vodou, potom s 0,23 M glycínom–HCl (pH 2,6), aby sa odstránili všetky neskonjugované protilátky alebo vedľajšie proteíny. Kolóna sa potom vyváži vo fosfátmi tlenenom fyziologickom roztoku (pH 7,3) spolu s vhodnými činidlami na solubilizáciu

membrán, ako sú napríklad detergenty, a supernatanty z bunkových kultúr alebo bunkové extrakty obsahujúce solubilizovaný peptid sa pomaly nechajú prejsť kolónou. Kolóna sa potom premyje s fosfátmi tlmeným fyziologickým roztokom spolu s detergentami až kým optická hustota A280 neklesne na úroveň pozadia, potom sa proteín vyluuje s 0,23 M glycínom-HCl (pH 2,6) spolu s detergentami. Purifikovaný proteín sa potom dialyzuje proti fosfátmi tlmenému fyziologickému roztoku.

## Príklad 6

### Rekombinantná príprava dipeptidu Ala-Pro

Exprimovanie Ala-Pro. Stratégia pre prípravu polypeptidu Ala-Pro v *E. coli* zahŕňala klonovanie opakovanej sekvencie kódujúcej Ala-Pro. K dispozícii je viacero komerčne dostupných systémov. Aby sa čas vyvíjania minimalizoval, kúpil sa komerčne dostupný exprimačný systém p-MAL (New England Biolabs). Systém využíva vektor obsahujúci gén pre proteín viažuci maltózu, ktorý sa nachádza vedľa polyväzbového miesta, na ktoré sa dá naklonovať daná sekvencia DNA, ako je napríklad kodón pre opakovanú sekvenciu Ala-Pro. Po indukcii klonu obsahujúceho uvedený vektor by sa exprimoval fúzny proteín (maltóza-Ala-Pro), doména viažuca maltózu by sa použila na viazanie maltózovej kolóny, a maltózová doména by sa po vyizolovaní rozštiepila faktorom X.

Pripravili sa dva komplementárne oligonukleotidy (87 mer a 91 mer), ktoré kódujú 14 Ala-Pro jednotiek a stop-kodón. Oligonukleotidy boli syntetizované štandardnými postupmi. Oligonukleotidy boli purifikované pomocou SDS-PAGE a vyextrahované z gélu. Bolo použité usmernené klonovanie s použitím tupého konca a kohezívneho konca, aby sa zabezpečilo správne zoradenie a ligácia génu ala-pro do plazmidu. Klony boli vyberané po transformácii baktérií *E. coli*. Analýza proteínov a indukčné experimenty s jedným klonom (AP/2) ukázali, že po indukcii sa vytvárali fúzne proteíny. Veľkosť prúžkov na géloch SDS-PAGE naznačuje, že

ide o viac ako jeden produkt fúzie. Avšak indukcia a príprava fúzneho proteínu je jasná.

Starosti o opätovné usporiadanie klonovanej sekvencie a správne rozpoznanie stop-kodónu vloženého do oligonukleotidu viedli k sekvenovaniu vsunutej DNA. DNA z klonu bolo sekvenované pomocou univerzálneho primeru M13. Je zaujímavé, že sekvencia inzertu kóduje 20 kópií sekvencie ALA-PRO namiesto 14 kópií Ala-Pro. Stop-kodón TAG je umiestnený na konci 20 kópií. Predpokladá sa, že sekvencia (Ala-Pro)<sub>20</sub> je prítomná pre tie dva oligonukleotidy, ktoré boli pospájané postupne, a výsledné medzery boli počas rekombinácie vyplnené polymerázou. Spájanie nie je neobvyklé, pretože ide o vysoko opakovanú sekvenciu. V tomto prípade to môže byť výhodné, pretože výsledkom je dlhší gén (čiže aj viac opakovaných Ala-Pro sekvencií).

Hydrolýza Ala-Pro substrátov. Tri bakteriálne kultúry, *Lactobacillus helveticus*, *L. sp.*, a *Xanthomonas maltophilia*, ktoré podľa literatúry vykazujú prolyldipeptidázovú aktivitu, boli získané z ATCC. Kultúry sa pestovali v 250 ml fľašiach a testovali sa na hydrolytickú aktivitu proti komerčne dostupnému kolorimetrickému substrátu Ala-Pro-pNA (zdroj). Vo všetkých troch kultúrach bola zistená aktivita, z ktorej väčšina bola asociovaná s bunkami (Tabuľka 1). Vzápätí sa pripravili zásobné kultúry na šikmých pôdach a v zmrazených FVM. Laktobacily pre optimálny rast potrebovali mikroaerofilnú komôrku pre šikmé kultúry a stacionárne kultivovanie v tekutých médiách vo fľašiach.

Tabuľka 1. Špecifická aktivita prolylpeptidáz na (ALA-PRO)<sub>2</sub>

Kultúra <sup>4</sup>	Špec. aktivita (U/mg) <sup>1</sup>	U/L <sup>1</sup>	Optimálne pH <sup>2</sup>	Optimálna teplota <sup>3</sup>
<i>L. helveticus</i>	0,156	8	5,6	50°C
<i>L. nezn. druh</i>	0,085	14,7	6,0	40°C
<i>X. maltophilia</i>	0,446	107	6,6	45°C

<sup>1</sup> Kde U – μmol ALA-PRO vylúčených/min pri 37°C a optimálnom pH

<sup>2</sup> Citrátový pufor pri optimálnej teplote

<sup>3</sup> Urobené pri pH 8,0

<sup>4</sup> Enzýmové extrakty z homogenizovaných buniek

Bolo potrebné získať substráty, ktoré by mohli odrážať aktuálny oligométny Ala-Pro substrát, ktorý by bol dostupný po kultivácii rekombinantnej *E. coli*. V tomto ohľade peptidové oligoméry na použitie ako prolylpeptidázové substráty boli syntetizované v Biosynthesis Inc. Bol vyvinutý HPLC postup na odseparovanie peptidov s nízkou molekulovou váhou a voľných aminokyselín na vyhodnotenie enzýmovej aktivity proti autentickým Ala-Pro substrátom. Peptidové polymerázy firmy Biosynthesis sa potom purifikovali pomocou HPLC. Po zhromaždení frakcií z HPLC sa získali Ala-Pro peptidy so sekvenciami opakovanými 2, 4 a 6-krát. Teploty peptidov a optimálne pH boli stanovené pre každý surový extrakt (tab. 2). *L. helveticus* poskytol najvyšší enzýmový výťažok a špecifické aktivity. Vo všetkých štúdiách boli použité komplexné médiá odporúčané z literatúry, neurobila sa nijaká optimalizácia médiá alebo skrínungu. Na základe rozdielov vo vzhľade hydrolytických produktov sa zdá, že laktobacily produkujú endo-prolyldipeptidázu a *Xanthomonas* produkujú exopeptidázu. Prínos tohto pozorovania vidieť z kombinácie enzýmov na dosiahnutie synergického účinku v hydrolyze Ala-Pro<sub>6</sub>.

Zdroj enzýmu	Proteín (mg/ml)	U/liter <sup>1</sup> (A-P) <sub>2</sub>	Špecifická aktivita (U/mg) <sup>1</sup>		
			(A-P) <sub>2</sub>	(A-P) <sub>4</sub>	(A-P) <sub>6</sub>
Lactobacillus helveticus	2,04	186	1,82	2,15	0,94
Lactobacillus neznámy druh	3,02	156	1,53	1,53	0,87
Xanthomonas maltophilia	0,70	28	0,17	0,35	0,43

<sup>1</sup> Jednotky definované ako mmol uvoľňovanie ALA-PRO za minútu pri 35°C a pH 7,0

<sup>2</sup> Enzýmové extrakty z homogenizovaných buniek.

Bolo zistené, že ak nadbytok enzýmu (600x koncentrovaného v porovnaní s normálnymi testovacími podmienkami) sa pridal k Ala-Pro, substrát Ala-Pro sa hydrolyzoval na alanín a prolín. Inhibítory metaloproteáz a cysteínových proteáz boli účinné v inhibovaní hydrolyzy Ala-Pro, kým na druhej strane mali malý účinok

na hydrolyzovanie Ala-Pro<sub>6</sub> na Ala-Pro, čo naznačovalo, že štiepenie Ala-Pro uľahčuje ďalší samostatný enzým. Čiastočná purifikácia by mala tiež odstrániť nežiadúce aktivity týchto extraktov.

V prípade dipeptidového medziproduktu Ala-Pro ďalšie spracovanie na finálny produkt známy ako enalapril a príbuzné zlúčeniny sa robí ako to je opísané v U.S. Patente č.4,374,829 a U.S. Patente č. 4,555,502, z ktorých oba sú za týmto účelom referenčne začlenené.

#### Príklad 7

Rekombinantná príprava dipeptidu Lys-Pro z rekombinantného rastlinného proteínu

Prírodzene sa vyskytujúce sekvencie bohaté na sekvencie kódujúce Lys-Pro sa nachádzajú v skupine génov kódujúcich proteíny bunkovej steny sóje (*Glycine max*) [Z: Hong *et al.*, *J. Biol. Chem.*,1990]. Tri proteínové gény sóje bohaté na prolín sú SbPRP1, SbPRP2, a SbPRP3, ktoré sú dlhé 256, 230 a 90 aminokyselín. Aminokyselinové zloženie týchto proteínov ukazuje, že 34 až 40 % zvyškov sú prolín, a 18 až 25 % sú lyzín. Je zvlášť zaujímavé, že SbPRP1 obsahuje 37 Lys-Pro aminokyselinových párov v peptidovej sekvencii a je preto výborným zdrojom dipeptidu Lys-Pro. Gén SbPRP3 kóduje 12 dipeptidových sekvencií Lys-Pro vrátane dvoch opakovaných sekvencií Lys-Pro-Lys-Pro kódovaných v géne na mieste 183 a 195 bp.

Klonovanie génu SbPRP1 génu bohatého na Lys-Pro sa robí generovaním PCR primerov na základe DNA sekvencií uvádzaných v literatúre. DNA fragmenty obsahujúce požadované sekvencie sa generujú pomocou primerov a knižnice obsahujúcej DNA sóje. Výsledná DNA bohatá na kodóny Lys-Pro je pripojená k vhodným reštrikčným v exprimačnom vektore. S použitím *E. coli* ako hostiteľa sú sójové peptidy exprimované a získané z lyzovaných buniek. Pomocou *Lactobacillus helveticus* alebo prolylpeptidázy odvodenej z tohto kmeňa sa proteín

hydrolyzuje na jednotlivé aminokyseliny a malé peptidy vrátane zvyškov Lys–Pro. Chromatograficky alebo extrakciou sa dá získať relatívne čistý Lys–Pro.

Alternatívny spôsob je syntéza oligonukleotidov zodpovedajúcich opakovaným sekvenciám Lys–Pro–Lys–Pro v SbPRP3 (alebo použitie dvoch setov chrbtami k sebe ktoré však v prirodzenej sekvencii nesusedia) zostavených s vhodnými reštrikčnými miestami pre vsunutie do daného exprimačného vektora. Výsledkom expresie v správnom hostiteľovi sú veľké množstvá Lys–Pro ako oligopeptidov. Použitím *Lactobacillus helveticus* alebo prolylpeptidázy odvodenej od tohto kmeňa sa peptid bohatý na lyzín a prolín hydrolyzuje na zvyšky Lys–Pro. Podobne, na hydrolýzu peptidu sa používa peptidáza špecifická pre prolín z *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto, T. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 42:2417, 1978). Chromatograficky alebo extrakciou sa dá získať pomerne čistý Lys–Pro.

V prípade dipeptidového medziproduktu Lys–Pro ďalšie spracovanie na finálny produkt známy ako lysinopril a príbuzné zlúčeniny sa robí ako to je opísané v U.S. Patente č.4,374,829 a U.S. Patente č. 4,555,502, z ktorých oba sú za týmto účelom referenčne začlenené.

#### Príklad 8

Rekombinantná príprava dipeptidu Ala–Pro z rekombinantného proteínu obojživelníkov

Kyslý polypeptid veľkosti približne 75 kDa vyskytujúci sa v zásobných granulách kožných buniek žaby *Xenopus laevis*, ktorý je uvádzaný ako APEG proteín, je bohatý na dipeptidy Ala–Pro (Gmachl, M. *et al.*, *FEBS Letters*, 260:145–148). Aspoň 80 % hmoty je alanín, prolín, kyselina glutámová a glycín v pomere 2:2:1:1.

Na izoláciu požadovaného fragmentu sa exprimačná knižnica cDNA v lambda–vektore môže prezeráť pomocou oligonukleotidových prób z opublikovanej sekvencie. Podobne, na prezeranie takej exprimačnej cDNA knižnice sa

môžu použiť aj protilátky proti APEG. Hľadaný fragment sa môže vyizolovať z daného klonu a môže sa vsunúť do exprimačného vektora. (Spracovanie výsledného peptidu je ako v Príklade 6 – hydrolýza substrátov Ala–Pro).

Výhodným spôsobom je syntetizovať oligonukleotid zodpovedajúci prírodným DNA sekvenciám APEG pre Ala–Pro–Ala–Pro–Ala–Pro (CACCAGCTCCAGCACCAG). V oligonukleotide s vhodnými reštrikčnými miestami sa DNA naklonuje do exprimačného vektora na exprimovanie v rekombinantnej hostiteľskej bunke ako je to uvedené vyššie. Polypeptid obsahujúci opakované sekvencie dipeptidového medziproduktu sa enzymaticky hydrolyzuje ako to je opísané vyššie, a dipeptidový medziprodukt Ala–Pro sa vyizoluje na ďalšie spracovanie na výsledný produkt.

V prípade dipeptidového medziproduktu Ala–Pro ďalšie spracovanie na finálny produkt známy ako enalapril a príbuzné zlúčeniny sa robí ako to je opísané v U.S. Patente č.4,374,829 a U.S. Patente č. 4,555,502, z ktorých oba sú za týmto účelom referenčne začlenené.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy dipeptidového medziproduktu zlúčeniny založenej na dipeptide, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa:

a) exprimovanie rekombinantnej molekuly DNA kódujúcej mnohočetné opakovanie sekvencie dipeptidového medziproduktu ako polypeptidu v rekombinantnej hostiteľskej bunke;

b) rozštiepenie polypeptidu z bodu a) enzýmom do voľného dipeptidového medziproduktu;

c) vyizolovanie a vyčistenie dipeptidového medziproduktu z bodu b); a

d) modifikovanie dipeptidového medziproduktu na prípravu zlúčeniny založenej na dipeptide.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dipeptidový medziprodukt je volený zo skupiny pozostávajúcej z Ala-Pro a Lys-Pro.

3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rekombinantná molekula DNA podľa nároku 1, je volená zo skupiny pozostávajúcej z SbPRP1, SbPRP2, SbPRP3 a APEG.