

**ENZIMES ELJÁRÁS C-TERMINÁLIS  $\alpha$ -KARBOXAMIDO-CSOPORTOT TARTALMAZÓ POLIPEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

***Kivonat***

A találmány C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó polipeptidek előállítására alkalmas enzimes eljárásra vonatkozik.

A találmány szerinti eljárással úgy állítanak elő C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó polipeptideket, hogy

(i) vízbázisú közeget, amely

(a) ammóniareagenst és

(b) olyan szubsztrátpolipeptidet foglal magában, amely legalább egy olyan középső aminosavszekvenciából áll, amely rendelkezik egy szomszédos aminosavmaradék  $\alpha$ -amino-csoportjához  $\alpha$ -karboxil-csoportjával peptidkötésen keresztül kapcsolódó, C-terminális Arg-maradékkal,

(ii) klosztripainnal érintkeztetve hasítják a peptidkötést, és így C-terminális Arg-NH<sub>2</sub>-maradékkal rendelkező polipeptidterméket állítanak elő.

Klosztripain helyett adott esetben aktivált immobilizált klosztripaint is alkalmazhatnak.

 2001. 10. 18.

## ENZIMES ELJÁRÁS C-TERMINÁLIS $\alpha$ -KARBOXAMIDO-CSOPORTOT TARTALMAZÓ POLIPEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

A találmány C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó polipeptidek előállítására alkalmas enzimes eljárásra vonatkozik.

A DNS *in vitro* manipulálása lehetővé teszi idegen genetikai információ átvitelét gazdasejtekbe abból a célból, hogy igen sokféle gazdasejtben – például gazdamikrobákban – befolyásolják az endogén és az idegen fehérjék expresszivitásának mértékét. A rekombináns DNS-technikák lehetőséget adnak a fehérjék és a peptidek expresszivitásának szelektálására, erősítésére és manipulálására.

A rekombináns DNS-technikával előállított fehérjéken vagy peptideken bizonyos módosításokat azonban nem lehet végrehajtani a DNS-szekvencia megváltoztatásával. Sok természetben előforduló fehérje és peptid olyan C-terminális aminosavmaradékot tartalmaz, amelyben  $\alpha$ -karboxamido-csoport van. Amidocsoport azonban közvetlenül nem jön létre expresszió útján: genetikai expresszió eredményeként fehérje-elővegyület keletkezik. Az amidocsoportot a fehérje-elővegyület enzimes módosításával *in vivo* viszik be a molekulába. Különböző *in vitro* eljárások ismeretesek a C-terminális  $\alpha$ -karbonsav-csoportok  $\alpha$ -karboxamido-csoportokká való átalakítására, a rendelkezésre álló eljárások alkalmazását azonban rendszerint számos tényező korlátozza, így például a reakciókörülmények, a szelektivitás, az alkalmazott reagens(ek) típusa és/vagy a felhasználható hordozók típusai.

Ráadásul sok olyan kis lánchosszúságú idegen fehérje és oligopeptid van, amely gyakran nem tud sikeresen túltermelődni a legtöbb sejtszerű gazdaszervezetben, mert az expresszió után a gazdaszervezet újra asszimilálhatja a peptidet. Így például, ha a kí-

vánt peptid hosszúsága nem haladja meg a mintegy 60-80 aminosav-egységet, a végtermék felhalmozódása helyett rendszerint inkább bomlás következik be.

Ennek a problémának a megoldása céljából kis lánchosszúságú peptideket eddig rendszerint egy másik, nagyobb lánchosszúságú peptidet is magában foglaló fúziós peptid – például  $\beta$ -galaktozidáz vagy kloramfenikol-acetil-transzferáz – részeként vagy a kívánt peptid több másolatát magában foglaló rekombináns konstrukció – többkópiás konstrukció – formájában expresszáltak. A kívánt peptid(ek) előállításához az eredetileg expresszált konstrukciót általában mindkét esetben hasítani kell. A rekombináns konstrukciót gyakran úgy hasítják, hogy prekursor peptid(ek) keletkezzen(ek), amely(ek)ből azután utólagos transzlációs módosítással lehet előállítani a kívánt peptide(ke)t. Rendkívül előnyös lenne, ha rendelkeznék olyan további eljárással vagy eljárásokkal, amelyek lehetővé tennék, hogy a peptid elővegyület hasításával egyidejűleg  $\alpha$ -karboxamido-csoportot vigyünk be a hasítási termék C-terminális aminosavmaradékába.

A találmány tárgya C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó polipeptidek előállítására alkalmas eljárás. A találmány mindenekelőtt kiválasztott, arginintartalmú szubsztrátpolipeptidek enzimés módosítására vonatkozik, amelynek eredményeként a szubsztrátpolipeptid hasad, és C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó polipeptid termék keletkezik. Az eljárás szerint (a) a szubsztrátpolipeptidet ("első polipeptid" és (b) ammóniareagenst tartalmazó, főtémegegében vizet tartalmazó oldatot (c) klosztripainnal érintkeztetjük. A szubsztrátpolipeptid magában foglalja egy középső aminosavszekvencia legalább egy másolatát, tipikus esetben a középső aminosavszekvencia egynél több másolatát (vagyis többfunkciós konstrukció). A középső aminosavszekvencia C-terminális maradéka

argininmaradék, amely a szomszédos aminosavmaradékhoz  $\alpha$ -karboxil-peptid-kötéssel (vagyis "Arg-Xaa" peptidkötéssel) kapcsolódik. Tekintettel arra, hogy a klosztripain endopeptidáz, az Xaa aminosavmaradék olyan aminosavmaradék, amelynek  $\alpha$ -karboxil-csoportja peptidkötésen ("Arg-Xaa-Xaa") keresztül egy másik aminosavmaradékhoz vagy karboxil-blokkoló csoporthoz ("Arg-Xaa-R") kapcsolódik. A karboxil-blokkoló csoportok szerves funkciós csoportok, amelyek helyettesítik a karbonsav funkciós savcsoportját [vagyis a  $-C(O)OH$  csoport "-OH" részét], és képesek arra, hogy lehasadjanak vagy hidrolizálódjanak. Így a karbonsavcsoport [" $-C(O)OH$  csoport"] regenerálódik. A megfelelő karboxil-blokkoló csoportokra példaként megemlíjtük az észtercsoportok alkoxi-részét [például a  $-C(O)OR$  csoport etoxi- vagy benzil-oxi-részét], valamint egy nempeptid amidocsoport  $-NRR'$  részét [például egy  $-C(O)NRR'$  csoport  $NRR'$  részét]. Az  $-NRR'$ -rész nem helyettesített (vagyis  $NH_2$ ) vagy egy, illetve két szubsztituenssel helyettesített (például  $NHEt$  vagy  $NMe_2$ ) lehet. Ha ilyen szubsztrátpolipeptidet vízbázisú oldatban klosztripain jelenlétében ammóniareagenssel érintkeztetünk, a szubsztrátpolipeptid az argininmaradék  $\alpha$ -karboxil-peptid-kötésénél hasad, és létrejön a második polipeptid (a "polipeptid termék"), amely egy  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó C-terminális argininmaradékkal ("Arg- $NH_2$ " maradék) rendelkezik.

A leírásban használt "ammóniareagens" kifejezés olyan reagensre vonatkozik, amely "oldott szabad ammóniát" (vagyis vizes oldatban feloldódott ammóniát) foglal magában és/vagy képes arra, hogy szabad, oldott ammóniát bocsásson ki vizes oldatban olyan körülmények között, amelyek megfelelőek ahhoz, hogy a klosztripain amid keletkezését eredményezve hasítson ki arginintartalmú peptideket. Az ammóniareagens tartalmazhatja például – az oldott sza-

bad ammóniával egyensúlyban – az ammónia egy vagy több sóját. A szabad ammónia és a különböző sók relatív mennyiségei rendszerint az ezen a területen jártas szakemberek számára ismert különböző tényezőktől függenek, így például az oldat pH-jától, az oldatban jelen levő eltérő anionok relatív koncentrációjától és/vagy az ammónia egyes adott sóinak oldhatóságától. Tekintettel arra, hogy az ammónia ("NH<sub>3</sub>") pK<sub>a</sub>-értéke vizes oldatban körülbelül 9,2, mintegy 9-es pH-értéknél vagy 9 feletti pH-értékeknél az ammóniareagens legnagyobb része általában szabad ammónia formájában van jelen. Az ammónia pK<sub>a</sub>-értékét meghaladó pH-jú oldatokban az ammónia több mint fele rendszerint oldott szabad ammónia vagy ammónium-hidroxid ("NH<sub>4</sub>OH") formájában van jelen. Az is magától értetődik, hogy az ammónia sójának az anionrésze általában igen gyorsan kicserélődik más, az adott oldatban jelen levő anionokkal. Így egy 10-es pH-jú, kloridsó(ka)t ("Cl<sup>-</sup>"), acetátsó(ka)t ("OAc<sup>-</sup>") és szulfátsó(ka)t ("SO<sub>4</sub><sup>-</sup>") tartalmazó vizes oldatban az oldatban lévő ammóniareagens valószínűleg ammóniumkloridot ("NH<sub>4</sub>Cl"), ammóniumacetátot ("NH<sub>4</sub>OAc") és ammónium-szulfátot ["(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>"], valamint oldott szabad ammóniát és ammónium-hidroxidot ("NH<sub>4</sub>OH") tartalmaz. A találmány szerinti eljárás keretében tipikus esetben olyan, vízbázisú reakcióközeget alkalmazunk, amely legalább körülbelül 0,5 M ammóniareagenst tartalmaz. Úgy tűnik, hogy ha az ammóniareagens koncentrációja körülbelül 0,75 M és 1,5 M között van, együttesen lehet optimalizálni az amidált termék képződésének a sebességét, valamint a termékhozamot, ugyanakkor el lehet kerülni az enzimaktivitás jelentős mértékű gátlását. A leírásban az ammóniareagens koncentrációját a közegben oldott állapotban levő, szabad NH<sub>3</sub> ekvivalensekben kifejezett mennyiségével adjuk meg.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint a szubsztrát-

polipeptidből körülbelül 8,5-nél nem magasabb pH-jú – előnyös esetben gyakorlatilag semleges –, vízbázisú közeg (az "első vízbázisú közeg") felhasználásával oldatot készítünk. C-terminális Arg-NH<sub>2</sub> maradékkal rendelkező polipeptid termék előállítására céljából a szubsztrátpolipeptidet az α-karboxil-peptid-kötésnél hasíthatjuk olyan módon, hogy az oldat pH-ját legalább körülbelül 9,0 értékre, rendszerint körülbelül 9,0 és körülbelül 11,0 közötti értékre állítjuk be, és a szubsztrátpolipeptidet ammóniareagens jelenlétében a klosztripain immobilizált formájában ("immobilizált klosztripain") érintkeztetjük. A szubsztrátumot és az ammóniareagenst az immobilizált klosztripainnal előnyös esetben körülbelül 20 percnél, még előnyösebb esetben körülbelül 5 percnél nem hosszabb ideig érintkeztetjük.

Rendszerint úgy járunk el, hogy az első vízbázisú közeget bázikus vizes oldattal ("lúgos közeg") keverjük össze, hogy a pH-értéket növeljük rövid idővel az előtt, hogy a szubsztrátpolipeptidet és az ammóniareagenst az immobilizált klosztripainnal érintkezésbe hozzuk. Ennek a találmány szerinti megoldásnak az az egyik megvalósítási módja, hogy immobilizált klosztripaint tartalmazó gyantát töltünk egy kromatografáló oszlopba. A szubsztrátum törzsoldatát és a bázikus oldatokat közvetlenül az oszlopba való bevezetésük előtt keverjük össze. Így a lehető legrövidebb az az időtartam, amíg a szubsztrátpolipeptid ki van téve a magas pH-jú vizes oldat hatásának. A találmány egyik tipikus megvalósítása módja szerint olyan bázikus vizes oldatot alkalmazunk, amely magában foglalja az ammóniareagenst. Nem kötelező azonban ezt a megoldást választani, mert az ammóniareagens egy része vagy teljes mennyisége már azt megelőzően jelen lehet a reakcióközegben, hogy annak pH-ját legalább körülbelül 9,0-ra növeljük.

Általában az is előnyös, ha a reakcióelegy pH-ját rövid idővel az immobilizált enzimmel érintkező polipeptid termék eltávolítása után körülbelül 8,5 alatti értékre, célszerűen gyakorlatilag semlegesre – például körülbelül 6,5 és körülbelül 8,0 közötti értékre – állítjuk be. Rendszerint úgy járunk el, hogy a polipeptid terméket tartalmazó reakcióelegy pH-ját körülbelül 8,5-re vagy 8,5 alatti értékre állítjuk be, amint az elegy kilép az immobilizált klosztripaint magában foglaló gyantaágyat tartalmazó oszlopból. Ez csökkenti annak a valószínűségét, hogy a polipeptid termék a klosztripainnal katalizált amidatív hasításnál alkalmazott, viszonylag magas pH-jú vizes közegben elbomlik. Ismeretes, hogy a polipeptidek hajlamosak arra, hogy magas pH-jú vizes közegekben hidrolízis útján racemizálódjanak és/vagy degradálódjanak.

Rendszerint előnyös olyan körülményeket alkalmazni, amelyek között a szubsztrátpolipeptidet ammóniareagens jelenlétében úgy érintkeztetjük az immobilizált klosztripainnal, hogy a szubsztrátum és a termék a lehető legrövidebb ideig legyen kitéve a magas pH-jú közeg hatásának. A találmány szerinti eljárást meg lehet valósítani olyan módon, amely lehetővé teszi, hogy a szubsztrátumot nagy hozammal alakítsuk át amidatív hasadási terméké, miközben legfeljebb körülbelül 30 percre csökkentjük azt az időtartamot, ameddig a szubsztrátum/termék oldat körülbelül 8,5-nél nagyobb pH-értéken érintkezik az immobilizált enzimmel. Az amidatív hasítást előnyösen olyan módon hajtjuk végre, hogy a szubsztrátum/termék oldat pH-ja legfeljebb körülbelül 20 percig, még előnyösebb esetben legfeljebb körülbelül 5 percig haladja meg a 8,5-ös értéket (a hasítási reakciót például körülbelül 2-5 perc alatt játszadjuk le).

#### A rajzok rövid ismertetése

Az 1. ábrán a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) 7,9

pH-jú közegben [1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2,5 mM DTT (ditiotreit = 1,4-dimerkopto-2,3-butándiol), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] klosztripain katalizátor alkalmazásával, 37 °C-on végrehajtott amidálására vonatkozó diagram látható, amellyel a kiindulási anyag, valamint a reakciótermékek relatív mennyiségének változását szemléltetjük az idő függvényében.

A 2. ábrán a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) 9,0 pH-jú közegben [1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2,5 mM DTT (ditiotreit = 1,4-dimerkopto-2,3-butándiol), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] klosztripain katalizátor alkalmazásával, 37 °C-on végrehajtott amidálására vonatkozó diagram látható, amellyel a kiindulási anyag, valamint a reakciótermékek relatív mennyiségének változását szemléltetjük az idő függvényében.

A 3. ábrán a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) 9,6 pH-jú közegben [1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2,5 mM DTT (ditiotreit = 1,4-dimerkopto-2,3-butándiol), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] klosztripain katalizátor alkalmazásával, 37 °C-on végrehajtott amidálására vonatkozó diagram látható, amellyel a kiindulási anyag, valamint a reakciótermékek relatív mennyiségének változását szemléltetjük az idő függvényében.

A 4. ábrán a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) 10,4 pH-jú közegben [1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2,5 mM DTT (ditiotreit = 1,4-dimerkopto-2,3-butándiol), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] klosztripain katalizátor alkalmazásával, 37 °C-on végrehajtott amidálására vonatkozó diagram látható, amellyel a kiindulási anyag, valamint a reakciótermékek relatív mennyiségének változását szemléltetjük az idő függvényében.

Az 5. ábrán a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) 11,0 pH-jú közegben [1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2,5 mM DTT (ditiotreit = 1,4-dimerkopto-2,3-butándiol), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] klosztripain katalizátor alkalmazásával, 37 °C-on végrehajtott amidálására vonatkozó diagram látható, amellyel a kiindulási anyag, valamint a reakciótermékek relatív mennyiségének változását szemléltetjük az idő függvényében.

A 6. ábrán Arg-tartalmú peptidek immobilizált klosztripain felhasználásával végezhető enzimes amidálásának megvalósítására alkalmas berendezés vázlatos rajza látható.

A 7. ábrán klosztripainnal katalizált, az enzim mobilizált formájának felhasználásával végzett amidatív hasításra vonatkozó diagram látható, amely a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozam változását szemlélteti az áramlási sebesség függvényében.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi argininmaradékot tartalmazó szubsztrátpeptidek amidatív hasítását és ilyen módon  $\alpha$ -karboxamido-csoporttal rendelkező C-terminális argininmaradékot ("C-terminális Arg-NH<sub>2</sub>") magában foglaló peptid termékek előállítását. Az eljárás szerint a szubsztrátpeptidet klosztripain jelenlétében, gyakorlatilag vizes oldatban ammóniareagenssel érintkeztetjük. Az enzim oldódó vagy immobilizált formában lehet jelen.

A leírásban használt "klosztripain" elnevezés az enzim mindkét természetes fajtájára és azok módosított változataira vonatkozik. A módosított változatok megőrzik a klosztripainnak azt a funkcionális képességét, hogy az Arg-Xaa peptidkötéseknél képes amidatív módon hasítani arginintartalmú peptideket. Megfelelő módosított klosztripainok például azok a funkcionális mutánsok, amelyek egy vagy több aminosavmaradék helyettesítése, hiánya és/vagy hozzákapcsolása miatt térnek el a természetes klosztripaintól. A klosztripain megfelelően módosított változatainak további példái közé tartoznak a klosztripain valamelyik funkcionális fragmentumát képviselő polipeptidek, amelyek megőrzik az arginintartalmú peptidek amidatív hasítására való képességüket. Ilyenek például egy természetes klosztripainnak azok a funkcionálisan aktív fragmentumai, amelyek úgy keletkeznek, hogy az enzimet alkotó alegységek közül egynek vagy többnek az aminocsoporttal és/vagy karboxilcsoporttal záródó végei-

ről számos aminosavmaradékot eltávolítunk.

A természetes klosztripain (B-klosztridopeptidáz) Clostridia-ból származó extracelluláris tiol-endoproteáz. Ez a proteázenzim heterodimer, és nem homologja más ismert tiol-proteázoknak. A beszámolók szerint ennek az enzimnek a molekulatömege körülbelül 30 000-80 000 dalton, az izoelektromos pontja (pI) pedig általában körülbelül 4,8-4,9. A klosztripaint először Clostridium histolyticum tenyészet szűrléséből különítették el [Mitchell és munkatársai: J. Biol. Chem., **243**(18), 4683-2602 (1968)]. Ez az enzim azzal tűnik ki, hogy igen szelektíven hat az Arg-Xaa-peptidkötésekre (mindenekelőtt az Arg-Pro-kötésekre), továbbá mind fehérjebontó, mind amidáz/észteráz aktivitással rendelkezik. Így például a klosztripain az inzulin elkülönített B-láncában 500-szor gyorsabban hasítja az Arg-Gly-kötést, mint a Lys-Ala-kötést, glukagonban pedig csak az Arg-Arg-, az Arg-Ala- és a Lys-Try-kötéseket hasítja. Az utóbb említett három kötésre vonatkozóan mért kezdeti relatív hidrolizálási sebességek az említés sorrendjében, 1, 1/7 és 1/300 [Labouesse: Soc. Chem. Biol., **42**, 1293 (1960)].

Ismeretes, hogy a klosztripain aktivitását sokféle aktivátor és inhibitor módosítja. A klosztripain aktivátorai közé tartoznak például a kalciumionok és a merkaptánok, így a cisztein, a 2-merkaptó-etanol és a ditiotreit. Az is ismert, hogy a klosztripain tozil-L-lizin-klór-metil-ke-ton, hidrogén-peroxid,  $\text{Co}^{2+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Hg}^{2+}$ - és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok, EDTA és citrátanion jelenlétében gátolt.

Klosztripaint elő lehet állítani mikroorganizmusok felhasználásával végzett fermentálással, például az 5 728 543 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett eljárás szerint. Ennek a szabadalmi leírásnak a szövegét a találmány ismertetését kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük. Az eljárás szerint addig te-

nyesztünk Clostridiát, amíg a klosztripain a tápközegben fel nem halmozódik. A megfelelő Clostridia-törzsekre példa a Clostridium histolyticum DSM 627. Clostridia-mutánsok és -változatok is alkalmasak, amennyiben ezek a mikroorganizmusok képesek klosztripaint szintetizálni.

A tenyésztést rendszerint anaerob körülmények között, egyféle vagy többféle mikroorganizmust tartalmazó tenyészetben végezzük, például nem kevert tenyészetben alámerítve, oxigén távollétében vagy fermentorokban, kívánt esetben inertgáz- vagy nitrogénatmoszférában. A fermentálást általában körülbelül 25-40 °C-on, 5 és 8,5 közötti pH-értéken hajtjuk végre. A tenyésztőközegben 1-3 nap elteltével rendszerint észlelni lehet az enzim felhalmozódását. A klosztripainszintézis a tenyészet logaritmikus növekedésének késői időszakában kezdődik meg és a stacioner növekedési szakaszban éri el a maximumot. Az enzimtermelődést aktivitásméréssel lehet figyelemmel kísérni [Mitchell: Meth. Enzym., **47**, 165-170 (1997)]. Bár az optimális fermentációs körülmények az egyes mikroorganizmusok esetében eltérőek, a megfelelő körülmények az ezen a területen jártas szakemberek számára már ismertek, vagy előzetes vizsgálatok eredményei alapján könnyen megállapíthatók. A klosztripain hagyományos eljárások alkalmazásával a tenyészet szűrletéből elkülöníthető és tisztítható, például metanolos vagy ammónium-szulfátos kicsapással, ioncseréléssel vagy gélpermeációs kromatográfálással. Ismeretesek az enzim rekombináció útján előállított formái is [Witte és munkatársai: Microbiology, **140**(5), 1175-1182 (1994)]. Ezeket a formákat is lehet alkalmazni a találmány keretében, amennyiben képesek az Arg-Xaa peptidkötések szelektív amidatív hasítására.

A klosztripaint – mielőtt az amidatív hasítási reakció lejátszatósához felhasználnánk – redukálószeres, például merkaptános keze-

léssel rendszerint aktiváljuk. [A merkaptánok funkciós tiolcsoportot ("SH") tartalmazó vegyületek.] A megfelelő redukálószer közé tartoznak olyan merkaptánok, mint például a ditiotreit ("DTT"), a ditioeritrit ("DTE"), a 2-merkaptó-etanol, a tioglikolsav és a cisztein. A klosztripain aktiválására felhasznált merkaptán koncentrációja tág határértékek – például körülbelül 0,05 mM és körülbelül 100 mM – között változhat. Az amidatív hasítási reakció lejátszatásához felhasznált enzim találmány szerinti aktiválását előnyös esetben körülbelül 0,1 mM és körülbelül 5 mM közötti merkaptánt (például DTT-t) tartalmazó vizes oldatban hajtjuk végre. Az ilyen módon és/vagy kalciumion-forrásnak a továbbiakban ismertetett módon való beadagolása útján aktivált enzimet közvetlenül alkalmazzuk vagy – kívánt esetben – aktivációs pufferből például kromatografálással vagy dialízálással felszabadítjuk.

Tekintettel arra, hogy a klosztripaint kalciumionok ( $\text{Ca}^{2+}$ -ionok) is aktiválják, az amidatív hasítási reakció lejátszatásához alkalmazott klosztripaint tartalmazó vizes oldatok általában kalciumion-forrást, például kalcium-kloridot is magukban foglalnak. A klosztripaint rendszerint például olyan vizes oldat formájában alkalmazzuk, amely körülbelül 0,01 mM és körülbelül 2 mM közötti koncentrációban tartalmaz kalcium-kloridot. Amint már említettük, a klosztripaint  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok hatásának való kitételrel aktiválni lehet, mielőtt a találmány szerinti eljárás megvalósításához felhasználnánk.

Az aminosavmaradékokat ebben a leírásban a szokásos egybetűs és hárombetűs rövidítésekkel (lásd 37 C.F.R. 1.822) jelöljük. A "Hse" rövidítés homoszerin-laktonra és/vagy homoszerinre vonatkozik. Ez a rövidítés egy aminosavmaradék két formájának olyan elegyét is jelölheti, amelyet metioninmaradék és cián-bromid reagáltatásával – például peptidok cián-bromidos hasításával – lehet elő-

állítani. A két forma – a homoszerin és annak laktonja – egymással egyensúlyban levő termékek elegyének formájában létezik. A két forma relatív mennyisége a pH függvényében változik. A szabad savként létező forma – a homoszerin – számára kedvezőek a nagyobb pH-értékek.

Az amidatív hasítási reakció lejátszatásához felhasznált vizes közeg a főtömegét alkotó víz mellett kis mennyiségben tartalmazhat vízzel elegyedő szerves oldószert is. A megfelelő vízzel elegyedő szerves oldószerek közé tartoznak például az alkoholok – így a metanol, az etanol, az 1,4-butándiol és a trifluor-etanol –, a ketonok, a karbamid, az amidok – így az N,N-dimetil-formamid ("DMF"), az N,N-dimetil-acetamid ("DMA") és az N-metil-pirrolidinon ("NMP") –, a karbonátok – így a propilén-karbonát –, az éterek – így a tetrahidrofurán – és az acetonitril. Megfigyeltük, hogy amíg a vizes közeg nem tartalmaz körülbelül 20 térf. %-nál több szerves oldószert, a vizes oldatban jelen levő szerves oldószer növeli a klosztripain fehérjebontó hatását, ugyanakkor csökkenti annak amidáló aktivitását. Ennek megfelelően a találmány szerinti amidatív hasítási reakciót rendszerint olyan vizes közegben játszadjuk le, amely legfeljebb viszonylag kis koncentrációban tartalmaz szerves oldószert. A vizes reakcióközeg általában legfeljebb körülbelül 10 térf. %, még előnyösebb esetben legfeljebb körülbelül 5 térf. % szerves oldószert tartalmaz. Bár tapasztalataink szerint a klosztripainnál az amidatív aktivitás/fehérjebontó aktivitás hányados rendszerint a szerves oldószertől gyakorlatilag mentes vizes közegekben a legkedvezőbb – vagyis ha az oldószer legfeljebb csak 1 térf. % szerves oldószert tartalmaz –, sok esetben előnyös, ha a közegben jelen van kis mennyiségű szerves oldószer. A vizes közegben különösen jól alkalmazható szerves oldószerek közé tartozik például a propilén-karbonát, az acetonitril és

az etanol.

Bár a hőmérséklet az amidatív hasítási reakció esetén is széles tartományban változhat, rendszerint körülbelül 4 °C és körülbelül 80 °C közötti reakcióhőmérsékletet alkalmazunk. Az amidatív hasítási reakciót előnyös 20 °C és 60 °C közötti, különösen előnyös körülbelül 25 °C és körülbelül 50 °C közötti hőmérsékleten lejátszatni. A találmány szerinti amidatív hasítási reakciót rendszerint legalább körülbelül 9,0 pH-jú vízbázisú közegben játszadjuk le. A találmány szerinti, enzimmel katalizált amidatív hasítási reakciót célszerű körülbelül 9,0 és körülbelül 11,0 közötti, különösen célszerű körülbelül 9,5 és 10,5 közötti pH-értéken lejátszatni.

A szubsztrátpolipeptidnek a megfelelő, C-terminális Arg-NH<sub>2</sub>-maradékot tartalmazó polipeptid terméké való amidatív hasításához szükséges idő a reakciókörülményektől függően tág határértékek között változhat. Így például, ha a reakciót egyfázisú oldatban játszadjuk le, a konverzió 15 perc és 48 óra közötti időtartam alatt gyakorlatilag végbemegy, de biztonság kedvéért rendszerint előnyös 30 perc és 6 óra közötti reakcióidőt alkalmazni. Amikor az amidatív hasítást a szubsztrátumnak és az ammónia reagensnek az immobilizált klosztripainnal való érintkeztetésével már befejeztük, megváltoztathatjuk a reakciókörülményeket, hogy a szubsztrátum nagy része – például legalább 40%-a – körülbelül 5 perc vagy még kevesebb idő alatt átalakuljon. A reakciósebességet – amint ez az ezen a területen dolgozó szakemberek számára ismert – sokféle tényezővel lehet befolyásolni, például a szubsztrátum, az ammóniareagens és az enzim koncentrációjával, a reakcióhőmérséklettel, a reakcióközeg pH-jával és azzal, hogy a reakcióközegben alkalmazunk-e szerves oldószert. Egy vagy több ilyen tényező beállításával el lehet érni a kívánt reakciósebességet és reakcióidőt.

Az amidatív hasítási reakció során alkalmazott, viszonylag magas pH-értékek a peptid bomlásához vezethetnek például hidrolízist eredményező hasítási reakciók és/vagy izomerizációs reakciók lejátszódása útján. Az L-aminosav-maradékok izomerizálódás útján a megfelelő D-izomereiké ("D-szennyezőanyag") alakulhatnak át. Azt tapasztaltuk, hogy a bomlási sebességet befolyásolják a reakcióközegben levő sók, oldószerek és más anyagok, valamint a reakcióközeg hőmérséklete és pH-ja. Így például amikor GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> 1 M ammónium-hidroxidot tartalmazó, 10,5-ös pH-jú vizes oldatát 45 °C-on 44 óra hosszat állni hagytuk, jelentős mennyiségű peptid bomlott el D-szennyezőanyaggá. Lényegesen kisebb mértékű bomlást (8% D-szennyezőanyagot) észleltünk, amikor hasonló, de semleges oldatot hagytunk 44 °C-on 44 óra hosszat állni, és gyakorlatilag nem tapasztaltunk bomlást, amikor hasonló oldatokat -20 °C-on és 4 °C-on hagytunk hasonló ideig állni.

Ezzel szemben, amikor GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> körülbelül 4 és 8,4 közötti pH-értékű vízben való oldással előállított oldatait -20 °C és 45 °C közötti hőmérsékleteken hagytuk hasonló ideig állni, gyakorlatilag nem észleltük D-szennyezőanyagok keletkezését. További kísérleteket végeztünk, amelyek keretében számos, 8,4 és 10,5 közötti pH-értéken 45 °C-on 25 órán keresztül vizsgáltuk a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> 1 M ammónium-klorid-oldatban végbemenő bomlását. A kísérletekből kiderült, hogy a peptid 8,4-es pH-értéken viszonylag stabil. Ilyen körülmények között jelentős mértékű (9%-os) bomlást mértünk 9,4-es pH-értéken, és ahogy a pH-értékek tovább emelkedtek, egyre nagyobb lett a bomlási sebesség. Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy az amidált peptidterméket a lehető legrövidebb ideig szabad csak kitenni viszonylag magas pH-jú – például legalább 9,5-ös pH-jú – közeg hatásának, hogy a szubsztrátum és az amidált

termék jelentős mértékű bomlását el lehessen kerülni.

Állandó pH-értéken és hőmérsékleten (pH = 10,0, t = 45 °C) vizsgáltuk azt is, hogy az  $\text{NH}_4\text{X}$  általános képletű ammóniumsók (ammóniumreagensek) – ahol X jelentése az ammóniumkation ellenionja, például hidroxid-, klorid-, acetát- vagy szulfátanion – koncentrációjának a változása hogyan befolyásolja a klosztripainnal katalizált amidatív hasítást. Az  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  koncentráció 0,5M-ről 1,0 M-re való növelésével (vizes ammónium-hidroxid-oldat pH-jának 10,0-ra való sósavas beállításával) a kívánt amidatív hasítási termék képződési sebessége és hozama anélkül növekedett, hogy a viszonylag magas pH-értékeken képződő D-szennyezőanyagok mennyisége jelentős mértékben fokozódott volna. Az ammónium-hidroxidot az  $\text{NH}_4\text{OH}$  képlettel jelöljük. Ezt a terméket – például ipari ammónium-hidroxid formájában – úgy gyártják, hogy ammóniát oldanak vízben. Az ammónium-hidroxid a vízben feloldódott ammónia hidrátjával egyensúlyban van; más szavakkal az az ammónium-hidroxid ( $\text{NH}_4^+\text{OH}^-$ ) és a vele egyensúlyban levő "szabad oldott  $\text{NH}_3$ " elegye. Tovább növelve az  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  koncentrációt (körülbelül 2 M-re) nem növekedett jelentős mértékben sem az amidált termék maximális hozama, sem a bomlástermékek mennyisége. Úgy tűnik azonban, hogy a nagyobb  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  koncentrációk gátolják az enzim működését, mert azáltal, hogy az  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  koncentrációt 1,0 M-ről 2,0 M-re növeltük, az amidált termék maximális hozamának eléréséhez szükséges idő csaknem megháromszorozódott. Úgy látszik tehát, hogy a körülbelül 1,0 M – például körülbelül 0,75 M és körülbelül 1,25 M közötti – koncentrációk hatással vannak az amidált termék képződésének sebessége és az amidált termék hozama közötti egyensúlyra, ugyanakkor megakadályozzák, hogy az enzim működése jelentős mértékben gátolt legyen. Lehetséges, hogy találunk olyan

klostripainváltozatokat, amelyek kevésbé érzékenyek a pH-ra és aktívabbak 10 körüli pH-jú oldatokban. Az amidáláshoz alkalmasak továbbá az ammóniumion különböző ellenionjai – például a szulfácion és a kloridion –, és logikusan arra lehet következtetni, hogy az ellenionok nem korlátozódnak ezekre az ionokra. Az oldatban végbe menő egyensúlyi reakcióknak köszönhetően az ammóniareagens rendszerint olyan elegy formájában létezik, amelyet  $\text{NH}_4\text{OH}$ , az ammónia egy vagy több sója – például  $\text{NH}_4\text{Cl}$  és/vagy  $\text{NH}_4\text{OAc}$  – és szabad  $\text{NH}_3$  alkot.

A találmány egyik alternatív megvalósítási módja szerint az amidatív hasítási reakciót le lehet játszani folyamatos üzemben például olyan módon, hogy a reaktánsokat – a szubsztrátpeptidet és az ammóniareagenst – tartalmazó vizes oldatot immobilizált klostripaint tartalmazó szuszpenzióval vagy gyantaággal érintkeztetjük. Számos különböző hagyományos eljárással lehet klostripaint immobilizációs hordozókhoz kapcsolni. Előállítottak már például olyan klostripainkészítményeket, amelyeket trezil- vagy aldehidcsoportokkal való reagáltatással rögzítettek agarózgéleken vagy metakrilát alapú gyantákon, illetve amelyeket cián-bromiddal aktivált agarózzal reagáltattak. Az ilyen módon készített gyanták tág határértékek között változó mennyiségekben tartalmazhatják a hozzájuk kapcsolt enzimet. A találmány keretében felhasználható gyanták rendszerint körülbelül 0,1 mg/ml és körülbelül 10 mg/ml – előnyös esetben körülbelül 1 mg/ml és körülbelül 5 mg/ml – közötti mennyiségben tartalmazhatnak immobilizált klostripaint. Ezek a készítmények ammónia jelenlétében, 10-es pH-értéken nagyon aktívak voltak a szubsztrátumok – például a  $\text{GLP-1(7-35)-Arg-Ala-Phe-Ala}$ -szekvenciát magukban foglaló polipeptidek – C-terminális  $\text{GLP-1(7-35)-Arg-NH}_2$  csoporttal rendelkező polipeptidek keletkezését eredményező amidatív hasítá-

sában. A hozamok rendszerint meghaladják a 40%-ot, az egyfázisú oldatokban lejátszódó reakciók esetében mért értékekhez hasonlóan. Az immobilizált klosztripaint tartalmazó gyanták – amelyeket oszlopokba lehet tölteni – nagyon hatásosan katalizálják az amidatív hasítási reakciót.

Immobilizált klosztripainnal általában úgy játszhatjuk le a reakciót, hogy a megfelelő vizes ammóniaoldatban levő szubsztrát-peptidet átszivattyúzzuk az oszlopon. Így nincs szükség arra, hogy a reakciótermékből klosztripaint távolítsunk el, amelynek a jelenléte esetleg gondot okozhat. A gyantához kötött klosztripaint a reakció lejátszatása előtt merkaptánokkal aktiválni lehet, illetve az amidálás során jelen lehet a redukálószer. Az enzimet rendszerint úgy tartjuk aktivált állapotban, hogy a reakcióközegbe egyszerűen merkaptánt (például DTT-t) és kalciumsót (például kalcium-kloridot) keverünk. Az immobilizált enzimmel működő reaktoron alapuló amidálás is lehetővé tesz olyan eljárást, amellyel a minimális értékre lehet csökkenteni azt az időt, ameddig a peptid ki van téve a magas pH-jú közeg adott esetben a termék bomlását eredményező hatásainak, és mindennek előtt minimális szintre lehet csökkenteni a D-szennyezőanyag képződését, valamint az oldalláncbeli dezamidálódást. Így például közvetlenül a reakcióelegynek a gyantaágyba való bevezetése előtt össze lehet keverni két folyadékáramot, amelyek közül az egyik peptidet tartalmaz olyan alacsony – például legfeljebb körülbelül 8,5-ös pH-jú – közegben, amelyben a peptid stabil, a másik pedig megfelelő összetételű ahhoz, hogy biztosítsa a végső pH-értékét és a kémiai körülményeket a reakció lejátszatásához. A szubsztrátum a gyantával rendszerint körülbelül 20 percnél – előnyös esetben körülbelül 5 percnél – rövidebb ideig érintkezik. Ezenkívül a termékoldatot – közvetlenül azután, hogy elhagyta a reaktort – előnyös esetben össze-

keverjük megfelelő savval vagy pufferoldattal, hogy a pH-értéket körülbelül 8,5-re vagy 8,5-nél kisebb értékre csökkentjük, amelyen az amidált termék sokkal stabilabb.

A találmány szerinti eljárás C-terminális argininmaradékot tartalmazó sokféle peptid amidált formájának előállítására alkalmas. Az előállítani kívánt célpeptid lehet bármely megfelelő, Arg-ra végződő polipeptid-szekvencia – például természetben előforduló szekvencia –, természetben előforduló módosított szekvencia, biológiailag aktív, nemtermészetes szekvencia, valamint a felsoroltak csonka formái és hasonló változatai. A peptidek molekulatömege 300 dalton és körülbelül 20 000 dalton – általában 400 dalton és 10 000 dalton – között lehet. Ezek a peptidek rendszerint 3-100, előnyös esetben 3-70 – aminosavmaradékot tartalmaznak. Ilyen peptidekre példák a növekedési hormont felszabadító faktorok, ezeknek a faktoroknak az elővegyületei, valamint funkcionális fragmentumai. A találmány szerinti eljárással C-terminálisan amidált peptidekké átalakítható szubsztrátpeptidek közé tartoznak például a következő polipeptidek:

**GLP(1-35)-Arg-Xaa-R (SEQ ID NO:2):**

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-  
-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-  
-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa-R

és

**GLP-1(7-35)-Arg-Xaa-R (SEQ ID NO:3):**

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-  
-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-  
-Xaa-R,

ahol R karboxilcsoportot blokkoló csoportot, aminosavmaradékot vagy peptidilcsoportot (vagyis két vagy több, egymáshoz  $\alpha$ -karboxil-peptidkötésekkel kapcsolódó aminosav-szekvenciát) jelent.

A találmány szerinti eljárást fel lehet használni a középső aminosavszekvencia egynél több másolatát magukban foglaló szubszt-rátpolipeptidek amidatív hasítására. Ezek a többkópiás konstrukciók a szomszédos másolatokat tartalmazhatják közvetlenül egymáshoz kapcsolódva ("egymással érintkezve"). A középső aminosav-szekvencia szomszédos másolatait azonban nagyon gyakran össze-kapcsoló szekvencia köti össze. Az összekapcsoló szekvencia ami-nosavak viszonylag rövid – rendszerint legfeljebb 5-10 aminosavma-radékból álló – szekvenciája, amely a távolságtartó láncok szerepét tölti be a középső aminosavszekvencia egymással szomszédos má-solatai között. Az összekapcsoló szekvencia aminosavmaradékait rendszerint úgy választjuk ki, hogy azok olyan további helyeket biz-tosítsanak, ahol enzimekkel vagy hasításra alkalmas vegyszerekkel szelektív hasítás hajtható végre.

A következő példákat a találmány szemléltetése céljából, to-vábbá azért közöljük, hogy az ezen a területen átlagos jártasságú szakembereket segítsük a találmány megvalósításában és alkalma-zásában. A példákkal egyébként semmilyen vonatkozásban nem kí-vánjuk korlátozni a találmány terjedelmét.

#### 1. példa

##### Klostripainnal katalizált amidálás 7,9-es pH-értéken

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1; 2 mg) szubszt-rátpeptidet feloldottuk 900 µl 1M vizes ammónium-hidroxid-oldatban, és a pH-t jégecet felhasználásával beállítottuk 7,9-re. A szubszt-rátoldatot ezután a klostripain beadagolása előtt 15 percig inkubál-tuk 37 °C-on. 1 mg klostripaint feloldottunk 1 ml mennyiségű, 1 mM kalcium-kloridot tartalmazó 25 mM ditiotreit-oldatban, majd az oldatot a környezet hőmérsékletén 15 percig állni hagytuk. A szubsztrátol-datot tartalmazó kémcsőbe 37 °C-on beadagoltunk 100 µl klostri-

pain-oldatot. a kémcsövet lezártuk, a benne levő elegyet a kémcső megforgatásával összekevertük és 37 °C-os fürdőben tartottuk.

A klosztripainnal katalizált reakció lefolyását úgy kísértük figyelemmel, hogy a reakcióelegyből időközönként – rendszerint 5 vagy 10 percenként – kipipettáztunk 25 µl-t. A kiindulási időponthoz tartozó mintát közvetlenül a klosztripain-törzsoldat beadagolása után vettük a reakcióelegyből. A reakcióelegyből kipipettázott mintákat jégecettel tízszeres térfogatra hígítottuk és 5 µ-os fázismegfordító C18-oszlopon kis lineáris gradienssel (35% B-ig 3 perc alatt, 45% B-ig további 6 perc alatt, majd 100% B-ig 12,3 perc elteltével jutottunk el) nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel elemeztük. Eluálószerként a következő puffereket használtuk: A: 95 térf.% víz, 5 térf.% acetonitril, 0,1 térf.% trifluor-ecetsav; B: 5 térf.% víz, 95 térf.% acetonitril, 0,1 térf.% trifluor-ecetsav.

Az eredmények (1. ábra) nem utalnak jelentős mértékű amidálásra. A primer reakció az Arg<sub>36</sub>-nál a GLP-1-(7-36)OH (SEQ ID NO:4) keletkezését eredményező amidálás nélkül végbemenő, az Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:6) eltávolítását eredményező hidrolízis volt, amely mellett a Lys<sub>34</sub>-nél kismértékű, GLP-1(7-34)OH (SEQ ID NO:5) keletkezéséhez vezető hidrolízis ment végbe. A GLP-1(7-36)OH (SEQ ID NO:4) mennyisége 5 perc elteltével elérte a kiindulási GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse) (SEQ ID NO:1)-re számított körülbelül 55%-os maximális értéket, majd a Lys<sub>34</sub>-nél hidrolízis útján végbemenő, GLP-1(7-34)OH (SEQ ID NO:5) keletkezését eredményező lassúbb hasítási reakciónak tulajdoníthatóan csökkent. A Lys<sub>34</sub>-nél bekövetkező hasadás azt mutatja, hogy ennek a másodlagos helynek az irányában is megmutatkozik bizonyos mértékű hidrolitikus aktivitás. A Lys<sub>34</sub>-nél megfigyelt, hidrolízis útján végbemenő szekunder hasadás jelentős mértéke egy kissé váratlan volt.

**GLP(7-36)OH (SEQ ID NO:4):**

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-OH.

**GLP(7-34)OH (SEQ ID NO:5):**

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys.

2. példa

Kloztripainnal katalizált amidálás 9,0 pH-értéken

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) kloztripainnal katalizált amidálását az 1. példában ismertetett eljárás és elemzés alkalmazásával 37 °C-on, 9,0 pH-értékű 1 M vizes ammónium-hidroxid-oldatban hajtottuk végre. A 9,0-ás pH-értéket jégecettel állítottuk be.

A 9,0-ás pH-értéken lejátszatott reakció eredményei (2. ábra) azt mutatják, hogy körülbelül 10 perc elteltével jelentős mértékű, 23,6% maximális GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozamot eredményező amidálás ment végbe. Az amidálás és a hidrolizálás aránya [a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/GLP1(7-36)OH hányados] 10 perc reakcióidő elteltével 1,4 volt. A Lys<sub>34</sub>-nél 9,0 pH-értéken végbemenő, GLP-1(7-34)OH keletkezését eredményező (az ábrán nem látható) hidrolízis lassúbb volt: 60 perc elteltével csak 7,4% GLP-1(7-34)OH-t mértünk.

**GLP-1(7-35)-Arg-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4):**

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>.

### 3. példa

#### Klosztripainnal katalizált amidálás 9,6-os pH-értéken

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) klosztripainnal katalizált amidálását az 1. példában ismertetett eljárás és elemzés alkalmazásával 37 °C-on, 9,6 pH-értékű 1 M vizes ammónium-hidroxid-oldatban hajtottuk végre. A 9,6-ás pH-értéket jégecettel állítottuk be.

Az eredmények azt mutatják (3. ábra), hogy a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozam 10 és 20 perc között volt a legnagyobb (38,1%). A 10 perchez tartozó amidálás/hidrolízis hányados 5,1 volt. A klosztripain aktivitása pH = 9,6 esetében valamivel kisebb volt, mint pH = 9,0 esetében (2. példa), aminek eredményeként a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozam későbbi időpontban érte el a maximális értéket.

### 4. példa

#### Klosztripainnal katalizált amidálás 10,4-es pH-értéken

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) klosztripainnal katalizált amidálását az 1. példában ismertetett eljárás és elemzés alkalmazásával 37 °C-on, 10,4 pH-értékű 1 M vizes ammónium-hidroxid-oldatban hajtottuk végre. A 10,4-es pH-értéket jégecettel állítottuk be.

A 10,4-es pH-értéken végzett amidálási kísérlet eredményei a 4. ábrán láthatók. Ezen a pH-n a maximális GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozamot (42,3%) körülbelül 30 perc elteltével értük el. A 30 perchez tartozó amidálás/hidrolízis hányados 4,7 volt. A GLP-1(7-34)OH-hozam 60 perc elteltével (az ábrán nem látható) 9,4% volt, a 9,0 és a 9,6 pH-értékekhez hasonlóan. Ez azt mutatja, hogy pH = 10,4 esetében Lys<sub>34</sub>-nél kisebb mértékű a hidrolizálódással végbemenő hasadás, mint kisebb pH-értékek esetében.

### 5. példa

#### Klosztripainnal katalizált amidálás 11,0-ás pH-értéken

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) klosztripainnal katalizált amidálását az 1. példában ismertetett eljárás és elemzés alkalmazásával 37 °C-on, 11,0 pH-értékű 1 M vizes ammónium-hidroxid-oldatban hajtottuk végre. A 11,0-ás pH-értéket jégecettel állítottuk be. A 11,0-ás pH-értékeken végrehajtott amidálás eredményei az 5. ábrán láthatók.

Ezen a pH-n 60 perc elteltével 27,6%-os GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4)-hozamot értünk el. A 60 perces reakcióidőhöz tartozó amidálás/hidrolízis hányados 7,0 volt. A reakció azonban sokkal lassabban ment végbe, mint a kisebb pH-értékek bármelyikén, és 60 perc elteltével még nem értük el a maximális hozamot. Ez a viszonylag nagy pH-érték sokkal kedvezőbb volt az amidálás, mint a hidrolízis útján végbemenő hasítás számára, mert a GLP-1(7-36)OH (SEQ ID NO:4)-hozam még 60 perc elteltével is kisebb mértékben nőtt, mint a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozam. A Lys<sub>34</sub>-nél ezen a nagyobb pH-értéken nem észleltünk GLP(7-34)OH (SEQ ID NO:5) keletkezését eredményező hidrolízist.

### 6. példa

#### GLP-1(7-36)-Ala-Phe-Ala-Met-His-Ala-Glu klosztripainnal katalizált amidálása

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Met-His-Ala-Glu (SEQ ID NO:7) klosztripainnal katalizált amidálását az 1. példában ismertetett eljárás és elemzés alkalmazásával 37 °C-on 1 M vizes ammónium-hidroxid-oldatban végeztük. Az amidálást 10,3-as és 10,8-as pH-értéken hajtottuk végre, és – az említés sorrendjében – 32,9%-os, valamint 12,4%-os maximális GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozamokat értünk el. Ezeket az

eredményeket az I. táblázatban összehasonlítjuk azokkal az eredményekkel, amelyeket akkor kaptunk, amikor a klosztripainnal katalizált amidálást úgy végeztük, hogy szubsztrátumként GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1)-et alkalmaztunk. Az eredményekből azt a következtetést lehet levonni, hogy az optimális pH-tartomány körülbelül 9,0-11,0, előnyös esetben 9,5-10,5.

### I. táblázat

#### Az amidálásnál elért hozam és szelektivitás a pH-függvényében

pH	Szubsztrátum	GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> <sup>a</sup> - hozam (%)	GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> / /GLP(7-36)OH <sup>b</sup> hányados
7,9	GLP(7-36)AFAHse	-	-
9,0	GLP(7-36)AFAHse	3,6	1,4
9,6	GLP(7-36)AFAHse	38,1	3,1
10,4	GLP(7-36)AFAHse	42,3	4,7
11,0	GLP(7-36)AFAHse	27,6 <sup>c</sup>	7,0
10,3	GLP(7-36)AFAHAE	32,9	-
10,8	GLP(7-36)AFAHAE	12,4	-

<sup>a</sup> Maximális hozam

<sup>b</sup> A maximális hozamhoz tartozó reakcióidőhöz rendelhető hányados és

<sup>c</sup> 60 perc elteltével (amikor a maximális hozamot még nem értük el).

#### 7. példa

##### Szintetikus szubsztrátumok amidálása

1 M ammónium-klorid-oldatban (pH = 10,4, mM DTT, 1 mM kalcium-klorid) 45 °C-on klosztripainnal együtt inkubáltunk olyan szintetikus szubsztrátumokat, amelyek Val-Lys-Gly-Arg-XXXX ("VKGRXXXX"; SEQ ID NO:8) általános szerkezetében XXXX jelentése 3 vagy 4 aminosavmaradékból álló peptidil-fragmentum. Különböző időközönként min-

tákat pipettáztunk ki a reakcióelegyekből, a reakciót befagyasztottuk jégecettel, és a mintákat kapilláris elektroforézissel analizáltuk. A II. táblázatban közöljük a különböző szubsztrátumok hasítására vonatkozóan azonos klosztripainkoncentrációk esetén 10 perc elteltével meghatározott százalékos értékeket. A főtermék minden esetben a Val-Lys-Gly-Arg ("VKGR-NH<sub>2</sub>"; SEQ ID NO:9) C-terminális  $\alpha$ -karboxamidja volt, amelyet HPLC-elemzéssel azonosítottunk. Világos, hogy a C-terminális fragmentum – amely jellegében igen sokféle lehet – az amidatív hasítás szempontjából még jelentős lehetőségeket rejt magában.

**II. táblázat**

A VKGR-XXXX általános szerkezetű szubsztrátum XXXX-része	A 10 perc reakcióidő után megmaradt szubsztrátum %-os mennyisége	SEQ ID NO
AFFG	50,7	10
AFAM	56,7	11
AFM	73,1	12
APAG	64,7	13
AFAHse	67	14
AFHse	71	15
LAFG	82,9	16
AAGG	81,9	17
ALAG	78,7	18
AAPG	82,5	19
LAAG	85	20
AAFG	80,8	21
QAQG	90,6	22
HAEG	95,4	23

8. példa

GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> laboratóriumi előállítása GLP-1(7-36)Ala-Phe-

-Ala-Hse klosztripainnal végzett amidatív hasításával

Rekombináns technológiával készített GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) liofilizált peptidet 4,24 mg/ml koncentrációnak megfelelő mennyiségben feloldottunk 1,16 M ammónium-hidroxid-oldatban (0,25 M HCl, 2,5 mM DTT, 1 mM CaCl<sub>2</sub>), amelynek a pH-ját 0,15 M nátrium-hidroxid-oldattal 10,5-re állítottuk be. Az oldathoz az enzim:szubsztrátum = 1:300 aránynak megfelelő mennyiségű klosztripaint adagoltunk. A reakció lejátszódásához 45 °C-on 4,5 órát biztosítottunk, mielőtt a reakciót 10 mM EDTA-oldattal befagyasztottuk. A GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4) terméket Amberchrome CG71-n, a fázisfordításhoz megfelelő körülmények között kromatografálva tisztítottuk, majd liofilizáltuk.

A peptid termék aminosavösszetétele a kísérleti hibahatáron belül azonos volt a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> elméleti összetételével, abszorpciós spektruma pontosan jelezte azt a tirozin- és triptofántartalmat, amelyre számítottunk, molekulatömege a MALDI-TOP tömegspektrométerrel meghatározva 3298 dalton volt (amely a kísérleti hibahatáron belül megegyezik a várt értékkel), szekvenciája azonos volt az elméleti szekvenciával, és a HPLC-elemzés során a GLP-1(7-36)OH-tól jól elkülönülve, a peptid egyik kereskedelmi forgalomban levő szintetikus mintájához hasonló módon vándorolt. A polipeptid terméket így GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-ként azonosítottuk.

9. példa

Szerves oldószerek hatása a klosztripain fehérjebontó aktivitására

1 ml mennyiségű, 8,5 pH-jú szubsztrátoldatot (2 mg N-Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid, 2,5 mM ditiotreit, 1 mM kalcium-klorid, 50 mM triclin puffer) a környezet hőmérsékletén 10 µg klosztripainnal együtt 10 térf.% szerves oldószert tartalmazó vizes oldatban inkubáltunk. A

kezdeti reakciósebességeket a felszabadult p-nitro-fenolát-anion fotometriás detektálásával határoztuk meg.

### III. táblázat

#### Oldószerek hatása a klosztripain fehérjebontó aktivitására

Szerves oldószerek	A szerves oldószer nélküli közegre vonatkoztatott aktivitás (térf.%)
Acetonitril	180
Propilén-karbonát	264
Trifluor-etanol	200
Dimetil-formamid	123
Dimetil-acetamid	108
Tetrahidrofurán	26
1,4-Butándiol	116
N-Metil-pirrolidinon	90

Ezeket a reakciókat ismét lejátszottuk a jelen levő szerves oldószerek koncentrációjának változtatásával. Meghatároztuk a fehérjebontó hatás szempontjából optimális koncentrációkat propilén-karbonátra (10%), N,N-dimetil-formamidra (20%), trifluor-etanolra (20%) és acetonitrilre (20%) vonatkozóan.

#### 10. példa

#### A klosztripain amidálási aktivitásának gátlása szerves oldószerekkel

Különböző szerves oldószerek jelenlétében határoztuk meg 45 °C hőmérsékletű, 10,4-es pH-jú oldatban (2 mM DTT, 1 mM kalcium-klorid, 2 M ammónium-acetát, 20 µg/ml klosztripain) a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) (2 mg/ml) maximális amidálási fokát. A reakcióelegyből szabályos időközönként mintákat pipettáztunk ki, amelyekben a reakciót ecetsavval befagyasztottuk. A mintákat fordított fázisú HPLC-oszlopon elemeztük nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás módszerrel.

#### IV. táblázat

##### Szerves oldószerek hatása a klosztripain amidálási aktivitására

Oldószer	Amidálási fok (az átalakult szubsztrátum %-os mennyisége)
Vizes kontrolloldat, amely nem tartalmaz szerves oldószert	44
20% trifluor-etanol	9
10% propilén-karbonát	29
20% acetonitril	18

A IV. táblázat adataiból kitűnik, hogy ezeknek az oldószereknek a jelenlétében az amidálási aktivitás nyilvánvalóan csökkent. Különböző koncentrációkban alkalmazott acetonitril és etanol jelenlétében 1:190 enzim/szubsztrátum tömegarány alkalmazásával 45 °C-on reakciósorozatot játszottunk le (1,25 M NH<sub>4</sub>OH, pH = 10,0, 2,5 mM DTT, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) (V. táblázat). Az acetonitril, illetve az etanol kis koncentrációkban kevésbé befolyásolta az átamidálási hozamokat, a reakciók sebességét és a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/GLP-1(7-36)OH hányadost, de csökkentette a keletkezett D-szennyezőanyagok mennyiségét.

#### V. táblázat

Oldószer	Maximális hozam (%)	A maximális hozam eléréséhez szükséges idő (min)	D (%)	GLP-1(7-46)NH <sub>2</sub> /GLP-1(7-36)OH
Víz	60	90	3,4	4,9
4% acetonitril	57	90	1	3,9
2% acetonitril	59	120	1,2	4,1
5% acetonitril	60	90	nd	5,2
10% etanol	58	150	nd	3,3
5% etanol	59	120	nd	4,0
2,5% etanol	62	90	nd	5,4

A táblázatban alkalmazott rövidítések:

nd: nem határoztuk meg;

D (%): a D-szennyezőanyagok százalékos mennyisége.

11. példa

Az ammóniakoncentráció hatása a transzamidálásra

Vizsgáltuk, hogy 10-es pH-értéken az ammóniakoncentrációk változásai (0,5 M, 0,75 M, 1,0 M, 1,25 M, 1,5 M és 2 M) hogyan befolyásolják a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) amidatív hasadását a következő reakciókörülmények között: 4 mg/ml GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1), 2,5 mM DTT, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, az enzim és a szubsztrátum aránya = 1:190. Az eredményeket a VI. táblázatban közöljük. Három ammóniakoncentrációnál: 1,0 M-nél, 1,25 M-nél és 1,5 M-nél hasonló hozamokat: az említés sorrendjében 43%-ot, 45%-ot és 44%-ot kaptunk. A három ammóniakoncentrációnál azonos (4,2%) volt a D-szennyezőanyagok mennyisége, és nagyjából a hányadosok is hasonlóak voltak.

**VI. táblázat**

**Az ammóniakoncentráció hatása**

NH <sub>4</sub> OH-koncentráció (M)	Maximális hozam <sup>a</sup> (%)	Idő <sup>b</sup> (min)	GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> /GLP-1(7-36)OH <sup>c</sup>	D-szennyezőanyagok <sup>d</sup> (%)
0,5	34	30	1,6:1	3,4
0,75	39	40	2,5:1	3,5
1,0	43	60	4,4:1	4,2
1,25	45	100	5:1	4,2
1,5	44	140	5,6:1	4,2
2,0	41	165	7,5:1	4,3

<sup>a</sup> A GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> maximális hozama.

<sup>b</sup> A maximális hozam eléréséhez szükséges idő.

<sup>c</sup> GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/GLP-1(7-36)OH hányados a maximális hozam

eléréséhez szükséges idő elérésekor.

<sup>d</sup> A termék D-aminosav képződésével végbemenő bomlása miatt keletkezett D-szennyezőanyagok százalékos mennyisége a maximális hozam elérésének időpontjában.

### 12. példa

#### Az ammóniumkation ellenanionjának hatása a transzamidálásra

Vizsgáltuk, hogy az ammóniareagensben jelen levő ellenanionnal kapcsolatos változások hogyan befolyásolják a transzamidálást. A reakciókat a pH két párhuzamosan végzett beállításával, vagyis ammónium-klorid, ammónium-acetát, illetve ammónium-szulfát jelenlétében játszottuk le. Az 1,28 mg/ml koncentrációban alkalmazott GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) amidatív hasítási reakcióját 45 °C-on játszottuk le 2,5 mM DTT-t és 1 mM kalcium-kloridot tartalmazó reakcióközegben, 1:190 enzim:szubsztrátum arány mellett, 1,25 M ammónium-hidroxid-oldat alkalmazásával, amelynek a pH-ját két párhuzamosan végzett ismétléssel – sósavval, ecetsavval, illetve kénsavval – 10,0-ra állítottuk be.

Az eredményeket a VII. táblázatban közöljük. A termékhozamok valamennyi reakció esetében közel azonosak voltak, csakúgy, mint a D-szennyezőanyagok mennyiségei. Az ellenanion jellege tehát csak kismértékben befolyásolja GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> keletkezésének vonatkozásában az amidálást.

### VII. táblázat

#### Az ammóniumkation ellenanionjának hatása

Ellenanion	GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> - hozam <sup>a</sup>	A D-szennyezőanyagok koncentrációja <sup>b</sup> (%)
Cl <sup>-</sup>	51%	4,7%
OAc <sup>-</sup>	51%	4,8%
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	42%	4,0%

<sup>a</sup> 150 perc elteltével egyik reakciónál sem értük el a maximális hozamot.

<sup>b</sup> A termék D-aminosav képződésével végbemenő bomlása miatt keletkezett D-szennyezőanyagok százalékos mennyisége 150 perc elteltével.

### 13. példa

#### A kalcium-klorid-koncentráció hatása az átamidálásra

1 mg/ml és 5 mg/ml koncentrációban alkalmazott GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) amidatív hasítását vizsgáltuk 1:200 enzim:szubsztrátum arány mellett olyan reakcióelegyekben, amelyek 1,25 M NH<sub>4</sub>OH és 2,5 mM DTT jelenlétében 0 mM, 0,1 mM, 1,0 mM, illetve 10 mM CaCl<sub>2</sub>-ot (VIII. táblázat) tartalmaztak. Kalcium-klorid hozzáadása nélkül nem észleltünk aktivitást; ez a kation tehát szükséges az aktivitás kifejtéséhez. A kalcium-klorid mennyiségének a 0,1 mM koncentrációt meghaladó mértékű növelése nem befolyásolja a transzamidálás hozamát.

#### **VIII. táblázat**

##### **A kalcium-klorid-koncentráció hatása az amidatív hasításra**

Kalcium-klorid-koncentráció (mM)	Szubsztrátkoncentráció (mg/ml)	Maximális hozam <sup>a</sup> (%)	GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> /GLP-1(7-36)OH <sup>b</sup>
0	1	NA	NA
0,1	1	60	4,6:1
1,0	1	59	4,4:1
10	1	59	4,4:1
0	5	2	-
2	5	47	4,3:1

NA: Nincs aktivitás.

<sup>a</sup> A GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> maximális hozama.

<sup>b</sup> GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/GLP-1(7-36)OH hányados a maximális hozam elérésekor.

#### 14. példa

##### Az enzimkoncentráció hatása az amidatív hasításra

1 mg/ml koncentrációban alkalmazott GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1) amidatív hasítását vizsgáltuk 45 °C-on, nitrogén-atmoszférában, 1:200, 1:400, 1:800 és 1:400 enzim:szubsztrátum arányok mellett 1,25 M NH<sub>4</sub>OH-t, 2,5 mM DTT-t és 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó közegben, amelynek a pH-ját sósavval 10,0-ra állítottuk be. Az elemzést az 1. példa szerint végeztük. A GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-hozamok minden esetben 50% és 60% között voltak, de a maximális hozam eléréséhez szükséges idő kisebb enzim:szubsztrátum arányok mellett lényegesen hosszabb volt, és 1:800-nál elérte a 360 percet. A magasabb szubsztrátkoncentráció esetében még észlelhető volt a termék keletkezése, bár a reakció kevesebb terméket eredményezett, és a maximális hozam eléréséhez hosszabb időre volt szükség. Amint várni lehetett, a magas pH-értékeken a reakcióidő növekedésével nőtt a D-szennyezőanyagok mennyisége, mert a szubsztrátum és a termék hosszabb ideig volt kitéve lúgos pH-jú közeg hatásainak.

#### **IX. táblázat**

##### **Az enzim:szubsztrátum arány hatása az amidatív hasításra**

Szubsztrát-koncentráció <sup>a</sup> (mg/ml)	Enzim:szubsztrátum arány	Maximális hozam <sup>b</sup>		D-szennyezőanyagok <sup>c</sup> (%)
		(%)	(min)	
1	1:200	59	90	3%
1	1:400	60	190	4,5%
1	1:800	58	360	6%
5	1:400	51	90	-

<sup>a</sup> GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse (SEQ ID NO:1).

<sup>b</sup> A GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> maximális hozama és az eléréséig eltelt idő.

<sup>c</sup> A termék D-aminosav képződésével végbemenő bomlása miatt keletkezett D-szennyezőanyagok százalékos mennyisége a maximális hozam elérésének időpontjában.

### 15. példa

A klosztripain aktivitásának kifejtéséhez szükséges merkaptános reakció

A maximális aktivitás elérése céljából a klosztripaint rendszerint merkaptánnal kezeljük. Az aktivitás vizsgálatához a merkaptánként alkalmazott DTT-t 0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,5 mM és 5,0 mM koncentrációkban alkalmaztuk. Az amidálási reakció körülményei a következők voltak: 1 mg/ml GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse, 1,25 M NH<sub>4</sub>OH, pH-beállítás 10,0-ra sósavval, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 45 °C, N<sub>2</sub> (g) és 1:400 enzim:szubsztrátum arány. A reakcióelegyet az 1. példában leírtak szerint vizsgáltuk.

DTT hozzáadása nélkül csak 20%-os hozammal képződött a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> amidálási termék. A 0,5-5 mM koncentrációban alkalmazott DTT jelenlétében lejátszatott reakciók hozama minden esetben körülbelül 60% GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>. Az enzimet tehát redukálószerrel – például merkaptánnal – kell redukálni ahhoz, hogy az amidatív hasításnál optimális hozamokat érjünk el.

### 16. példa

Amidálás egyéb Arg-specifikus proteázok alkalmazásával

GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse-t 0,5-2 mg/ml koncentrációnak megfelelő mennyiségben feloldottunk 1 M 10-es, illetve 8,5-ös pH-jú ammónium-hidroxid-oldatban és külön-külön inkubáltunk 6 különböző fehérjebontó enzimmal, amelyek közül öt – a klosztripainhoz hason-

lóan – specifikusan az argininmaradékok karboxil-peptid kötésénél hasítja a peptideket. Ezek az enzimek a következők voltak: tripszin, trombin, B-katepszin (5,5-ös pH-értéknél is vizsgáltuk), Xa koagulációs faktor, plazmin és papain. A papain olyan tiol-proteáz enzim, amely az arginil-kötésekre nézve nem specifikus. Az 1. példában ismertetett fordított fázisú kromatográfiás vizsgálat szerint ezek közül a proteázok közül egyik sem termel GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-t. Az enzim:szubsztrátum arányok 1:50-1:100 között voltak, és szükség esetén proteázspecifikus adalékanyagokat (például kalcium-kloridot) alkalmaztunk. Ilyen körülmények között csak a klosztripain termelt mérhető mennyiségű GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-t.

#### 17. példa

##### A klosztripain affinitáskromatográfiás tisztítása

A klosztripaint affinitáskromatográfiás módszerrel [Ullmann és munkatársai: Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **375**, 89-92 (1994)] megtisztítottuk egy olyan kettősfalú, 1,2 cm belső átmérőjű oszlopban, amelybe a 11 cm-es ágymagasság eléréséig Toyopearl TSKgel AF-Red gyantát töltöttünk. Az A-puffert (25 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 8) és a B-puffert (25 mM Hepes, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, pH = 8) átszűrtük 0,45 µm-es nejlonszűrőn, majd a szűrleteket vákuumban 10 percig gázmentesítettük.

57,3 mg klosztripaint (Worthington) feloldottunk 3 ml mennyiségű, 15% B-puffert tartalmazó A-pufferben (14,5 mg/ml), és az oldatot 1 ml/min sebességgel felvittük az oszlopra, amelyet előzőleg 15% B-puffert tartalmazó A-pufferrel egyensúlyba hoztunk. Az oszlopot 15% B-puffert tartalmazó A-pufferrel 5 percig eluáltuk, majd az A-puffert és a B-puffert tartalmazó elegyben a B-puffer koncentrációját 40 perc alatt lineáris gradienssel 15%-ról 100%-ra növeltük. A frakciókat összegyűjtöttük, és az amidálást katalizáló képességük

alapján klosztripaint tartalmazóknak minősített frakciókat együtt kezelve körülbelül az 5 mM koncentráció eléréséig ditiotreittel kiegészítettük és az 5 mg/ml-es koncentráció eléréséig ultraszűréssel töményítettük.

### 18. példa

#### A klosztripain immobilizálása Toyopearl AF-Formyl-650M gyantán

Tartósítószeret tartalmazó szuszpenzió formájában szállított Toyopearl AF-Formyl-650M gyantát töltöttünk egy 10 ml-es, 45  $\mu$ m-es frittet tartalmazó, egyszer használatos oszlopba, majd két oszloptérfogatnak megfelelő mennyiségű, 0,1 M Mes-pufferrel (5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH = 5) öblítettük. 5 mM Hepes-t és a fentiek szerint tisztított klosztripaint tartalmazó, 8-as pH-jú oldatot azonos mennyiségű 0,1 M Mes-sel hígítva beállítottuk a végső, 5,5-es pH-értéket, majd a hígított oldatot a víztelenített gyantához adtuk. Ezután beadagoltunk 150  $\mu$ l 1 M nátrium-ciano-bór-hidrid-oldatot, és a gyantaszuszpenziót 23-25 °C-on a lefedett oszlop folyamatos forgatásával 20 órán keresztül kevertük. Az oszlopot víztelenítettük, és az eluáló oldatot elemzés céljára megőriztük. A gyantát két oszloptérfogatnyi 1 M Trisz-HCl-lel (5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH = 7,8) mostuk. Ezután 50  $\mu$ l nátrium-ciano-bór-hidriddel együtt beadagoltunk ebből a pufferből egy oszloptérfogatnyi mennyiséget, majd a kapott elegyet egy óra hosszat kevertük. A gyantát ezután 1 M nátrium-kloridot, 25 mM Hepes-t és 5 mM kalcium-kloridot tartalmazó, 8-as pH-jú oldat 10 oszloptérfogatnyi mennyiségével, majd ugyanilyen mennyiségű, nátrium-kloridot nem tartalmazó pufferrel mostuk. A kapott klosztripaingyantát az oldat enzimveszteségének mérésével elemeztük. Az elemzés szerint 1 ml gyanta 1,8-4,4 mg enzimet kötött meg. A klosztripaingyantát felhasználásáig 4 °C-on ebben a pufferben tároltuk.

Más gyantákon ehhez hasonlóan megkötött klosztripainnal is hasonló eredményeket kaptunk. Példaként a Toyopearl Amino Link és Toyopearl Formyl 650 M (Toso Haas, Inc.) aldehid alapú gyantákat és az Ultra Link (Pierce) lakton alapú gyantát említjük meg. Ezek a gyanták az enzim szabad aminocsoportjaihoz kötődnek. Mindezek az immobilizált klosztripaint tartalmazó gyanták akár 77%-ot is elérő – általában 50-60%-os – hozammal végzik el a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse/GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> amidatív hasítását.

### 19. példa

#### Immobilizált klosztripiannal katalizált reakciók

50 mM Hepes-ben (5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 8,5) 40 ml mennyiségű, immobilizált klosztripaint tartalmazó gyantát töltöttünk be 35 ml/min sebességgel egy 2,5 cm belső átmérőjű, üveggöpennyel ellátott oszlopba, amely áramláselosztóval és kényszeráramlású szivattyúval volt felszerelve. A göpenyen keresztül 47 °C hőmérsékletű vizet keringeltünk. A gyantát ezután 200 ml mennyiségű, 8,5 pH-jú, 1 mM DTT-t és 1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó, 8 ml/min sebességgel áramoltatott oldattal mostuk 47 °C-on. A leírt módon végrehajtott előkészítés után az oszlop készen állt az amidatív hasításhoz.

A GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse folyamatos amidatív hasításához a 6. ábrán látható készüléket használtuk. A 13 l mennyiségű, 1,25 mM sósavat tartalmazó, 7,5%-os vizes acetonitril oldat felhasználásával elkészített, 0,65 mg/ml koncentrációjú szubsztrátoldatot ("1. oldat") vízfürdön 47 °C-on egyensúlyba hoztuk és az 1. csővezetéken át csatlakoztattuk a perisztaltikus szivattyúhoz, amely kiömlőnyílásával az 1. T-csatlakozóba volt bekötve. 13 liter mennyiségű 2,5 M ammónium-hidroxid-oldatot (2 mM DTT, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) készítettünk, amelynek pH-értékét 10,0-ra állítottuk be ("2. oldat") koncentrált sósavval. A 2. oldatot a 47 °C-os vízfürdőbe tettük, majd a 2.

csővezetéken át csatlakoztattuk a kényszeráramlású szivattyúhoz, amely szintén a T-csatlakozóba volt bekötve. A 3. csővezeték a környezet hőmérsékletén levő 3. oldatot (1,25 M HCl) a szivattyún keresztül az oszlop kifolyónyílásával is összeköttetésben levő 2. T-csatlakozóhoz szállította. A 2. T-csatlakozóból távozó anyagot mint reakcióterméket összegyűjtöttük. A szivattyúhoz csatlakozó csővezetékek ténylegesen 3,2 mm belső átmérőjű Tygon-csővekből készültek, és az 1., a 2., valamint a 3. csővezetékbeli szivattyúzási sebességek – amelyek értéke körülbelül 3-6 ml/min volt – azonosak voltak. A szivattyúzás során az 1. oldat és a 2. oldat az 1. T-csatlakozónál találkozott és 10-es pH-jú oldatot képezve összekeveredett. Ez az oldat az 1. T-csatlakozót elhagyva az oszlop felé áramlott, majd mintegy 6 ml/min térfogatsebességgel áthaladt az oszlopon és beáramlott a 2. T-csatlakozóba. A 2. T-csatlakozóban az oszlopból távozó oldat összekeveredett az 1,25 M sósavoldattal, amelynek az volt a feladata, hogy a GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-t tartalmazó reakcióoldat pH-ját körülbelül 8,5-re csökkentse. Az alkalmazott áramlási sebesség mellett a szubsztrátum és a termék mintegy 5 percig érintkezett a gyantával, így tehát a szubsztrátum és/vagy a termék legfeljebb csak körülbelül 5 percig volt kitéve a 10-es pH-jú közeg hatásának.

Az oszlopból a 2. T-csatlakozóhoz távozó oldatból időközönként vett mintáknak az 1. példában leírtak szerint elvégzett HPLC-elemzések mérte értékek alapján gyakorlatilag úgy szabályoztuk az áramlási sebességet, hogy a lehető legnagyobb legyen a termékhozam és a lehető legkisebb legyen a szennyezőanyagok mennyisége. A 7. ábrán látható, hogy a fentiekben ismertetett körülmények között lejátszatott reakció milyen eredménnyel ment végbe. Az ábrán a hozam, valamint az oszlopon belüli áramlási sebesség változását szemlélítjük a kísérleti idő függvényében. GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>-képződés

esetében, 14 ml/min nettó áramlási sebesség mellett az átlagos hozam – közel 64%-os maximummal – 50% közelében volt. Ha túl gyors volt az áramlás, a hozam esett: 44 ml/min áramlási sebesség-nél például 34%-ra csökkent. Amikor az áramlási sebességet 16 ml/min értékre csökkentettük, a hozam visszaállt az 50% körüli értékre.

Amikor a termékképződés nem optimális, az áramlást mérsékeljük abban az esetben, ha a termék kis hozammal képződik (vagyis hagyjuk, hogy a szubsztrátoldat hosszabb ideig legyen kitéve a gyantához kötődő klosztripain hatásának), illetve az áramlást fokozzuk abban az esetben, ha a Lys<sub>34</sub>-nél végbemenő hasadás eredményeként keletkező GLP-1(7-34) mennyiségének növekedése miatt nyilvánvaló, hogy az enzim hatásának időtartama túl hosszú. Az ezen a területen járatos szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a termékképződés optimalizálása céljából lehet szabályozni még a paramétereket is, így például meg lehet változtatni a semlegesítésre használt sósav koncentrációját, a szubsztrátum koncentrációját, a hőmérsékletet, a szerves oldószer koncentrációját és egyéb olyan tényezőket, amelyek befolyásolják az immobilizált klosztripain hatását.

#### 20. példa

#### Az oszlopbeli paraméterek hatása az immobilizált klosztripainnal végzett amidatív hasításra

A X. táblázatban foglaljuk össze annak a reakciósorozatnak az eredményét, amelyet két eltérő gyantán immobilizált klosztripain felhasználásával valósítottunk meg. Táblázatos formában közöljük, hogy a 19. példában leírtak szerint, az ott ismertetettekhez hasonló körülmények között, de 1x15 cm-es oszlop alkalmazásával lefolytatott reakciókat hogyan befolyásolja az áramlási sebesség, a GLP-

1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse koncentrációja, a hőmérséklet, a gyanta mennyisége és a GLP-1(3-36)NH<sub>2</sub> hozama. Azt a végkövetkeztetést vontuk le, hogy a hőmérséklet mérséklésével általában csökken a hozam (a táblázatban szereplő első négy, 23 °C-hoz tartozó adat összehasonlítása a 45 °C-hoz tartozó adatokkal). Ugyanezt tapasztalható az áramlási sebességek (az 1. és a 2., a 3. és a 4., valamint a 6. és a 7. adatok összehasonlítása) és a GLP-1(7-36)Ala-Phe-Ala-Hse-koncentrációk lényeges megváltoztatása esetén is. Ezeknek a paramétereknek és az oszlopban lejátszódó reakció egyes paramétereinek a megváltoztatása befolyásolhatja a hozamot. Ennek a vizsgálatnak a keretében a hozamok a reakciók lejátszatásakor éppen fennálló körülményektől függően 4% és 63% között változtak, ami azt mutatja, hogy ezeket a reakciókat az oszlopbeli különböző paraméterek változtatásával optimalizálni lehet.

### X. táblázat

#### Enzimes reaktorkísérletek összehasonlítása

Alapgyanta	GLP-1(7-36)APAHse (mg/ml)	Áramlási sebesség (ml/min)	Hozam (%)	Hőmérséklet (°C)
1. AminoLink	0,1	1	56	23
2. AminoLink	0,14	0,1	24	23
3. AminoLink	1	0,1	4	23
4. AminoLink	1	4	11	23
5. AminoLink	0,14	0,5	61	45
6. AminoLink	1	4	48	45
7. AminoLink	1	3	57	45
10. AminoLink	0,1	3	63	45
11. AminoLink	0,25	2	50	45
12. Toyopearl Formyl	0,25	2-4	60	45

13. UltraLink	0,25	1	46	45
14. Toyopearl Formyl	0,25	2	62	45
15. Toyopearl Formyl	0,5	2	57	45
16. Toyopearl Formyl	1	2	53	45

A találmányt különböző konkrét, példaként szolgáló megvalósítási formákkal és módszerek ismertetésével szemléltettük. Ezzel kapcsolatban azonban meg kell jegyeznünk, hogy az ismertetetteken kívül sok olyan változat és módosítás van, amely nem jelent eltérést a találmányi gondolattól és nem haladja meg a találmány terjedelmét.

### Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó polipeptidok előállítására, **azzal jellemezve**, hogy

(i) vízbázisú közeget, amely

(a) ammóniareagenst és

(b) olyan szubsztrátpolipeptidet foglal magában, amely

legalább egy olyan középső aminosavszekvenciából áll, amely rendelkezik egy szomszédos aminosavmaradék  $\alpha$ -amino-csoportjához  $\alpha$ -karboxil-csoportjával peptidkötésen keresztül kapcsolódó, C-terminális Arg-maradékkal,

(ii) klosztripainnal érintkeztetve hasítjuk a peptidkötést, és így

C-terminális Arg-NH<sub>2</sub>-maradékkal rendelkező polipeptidterméket állítunk elő.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy vízbázisú közegként legalább körülbelül 80 térf.% vizet tartalmazó közeget alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan vízbázisú közeget alkalmazunk, amely legfeljebb körülbelül 10 térf.% szerves oldószert foglal magában.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan vízbázisú közeget alkalmazunk, amely szerves oldószertől gyakorlatilag mentes.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan ammóniareagenst alkalmazunk, amely ammónium-kloridot, ammónium-hidroxidot, ammónium-acetátot és/vagy ammónium-szulfátot foglal magában.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan vízbázisú közeget alkalmazunk, amely legalább körülbelül 0,5 M ammóniareagenst tartalmaz.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a szubsztrátpolipeptidet és az ammóniareagenst körülbelül 4 °C és körülbelül 80 °C közötti hőmérsékleten érintkeztetjük a klosztripainnal.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a középső aminosavszekvencia GLP-1(7-35)-Arg-ot foglal magában.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a középső aminosavszekvencia GLP-1(7-35)Arg-Ala-Phe-Ala-t foglal magában.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a középső aminosavszekvencia GLP-1(7-35)Arg-Ala-Phe-Ala-Hse-t vagy GLP-1(7-35)Arg-Ala-Phe-Ala-Met-His-Ala-Glu-t foglal magában.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a középső aminosavszekvencia Xaa helyén aminosvmaradékot, R helyén pedig  $\alpha$ -karboxil-csoportot blokkoló csoportot tartalmazó GLP-1(7-35)-Arg-Xaa-R aminosavszekvenciát foglal magában.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a szubsztrátpolipeptid a középső aminosavszekvencia legalább két másolatát foglalja magában.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a középső aminosavszekvencia egymással szomszédos másolatai összekapcsoló szekvencián keresztül kötődnek egymáshoz.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a szubsztrátpolipeptidet és az ammóniareagenst olyan vízbázisú közegben érintkeztetjük a klosztripainnal, amelynek a pH-ja körülbelül 9,0 és körülbelül 11,0 között van.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan vízbázisú közeget alkalmazunk, amely további komponensként kalcium-kloridot tartalmaz.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan vízbázisú közeget alkalmazunk, amely további komponensként redukálószeret tartalmaz.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy redukálószerként merkaptánt alkalmazunk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy merkaptánként ditioneitet, ditioeritritet, 2-merkaptó-etanol, tioglikolsavat, ciszteint, glutationt vagy a felsoroltakból képezhető elegyet alkalmazunk.

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a klosztripaint immobilizált formában alkalmazzuk.

20. Eljárás C-terminális  $\alpha$ -karboxamido-csoportot tartalmazó

polipeptidek előállítására, **azzal jellemezve**, hogy

- elkészítjük az első vízbázisú közeget, amely tartalmaz egy olyan szubsztrátpolipeptidet, amely magában foglal legalább egy olyan középső aminosavszekvenciát, amely egy szomszédos aminosavmaradékhoz  $\alpha$ -karboxil-peptid kötésen keresztül kapcsolódó C-terminális Arg-maradékkal rendelkezik;

- az első vízbázisú közeget ammóniareagenst magában foglaló lúgos közeggel összekeverve előállítjuk a legalább körülbelül 9,0 pH-jú második vízbázisú közeget és

- a második vízbázisú közeget immobilizált klosztripainnal érintkeztetve az  $\alpha$ -karboxil-peptidkötésnél hasítjuk a szubsztrátpolipeptidet, és így termékként egy C-terminális Arg-NH<sub>2</sub>-maradékkal rendelkező polipeptid terméket magában foglaló vízbázisú közeget állítunk elő.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy olyan második vízbázisú közeget alkalmazunk, amelynek a pH-ja körülbelül 9,0 és körülbelül 11,0 között van.

22. A 20. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy egy további lépésben a termékként kapott vízbázisú közeg pH-jának a beállításával a polipeptid terméket magában foglaló, legfeljebb körülbelül 8,5-es pH-jú, harmadik vízbázisú közeget állítunk elő.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a 2. vízbázisú közeget az immobilizált klosztripainnal legfeljebb körülbelül 20 percig érintkeztetjük.

24. A 20. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a középső aminosavszekvencia GLP-1(7-35)Arg-ot foglal magában.

25. A 20. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy egy további lépésben az immobilizált klosztripain merkaptánnal, kalcium-kloriddal vagy merkaptán és kalcium-klorid keverékével végzett

aktiválásával aktivált immobilizált klosztripaint állítunk elő, és az érintkeztetési művelet során a második vízbázisú közeget az aktivált immobilizált klosztripainnal érintkeztetjük.

BIONEBRASKA, INC.

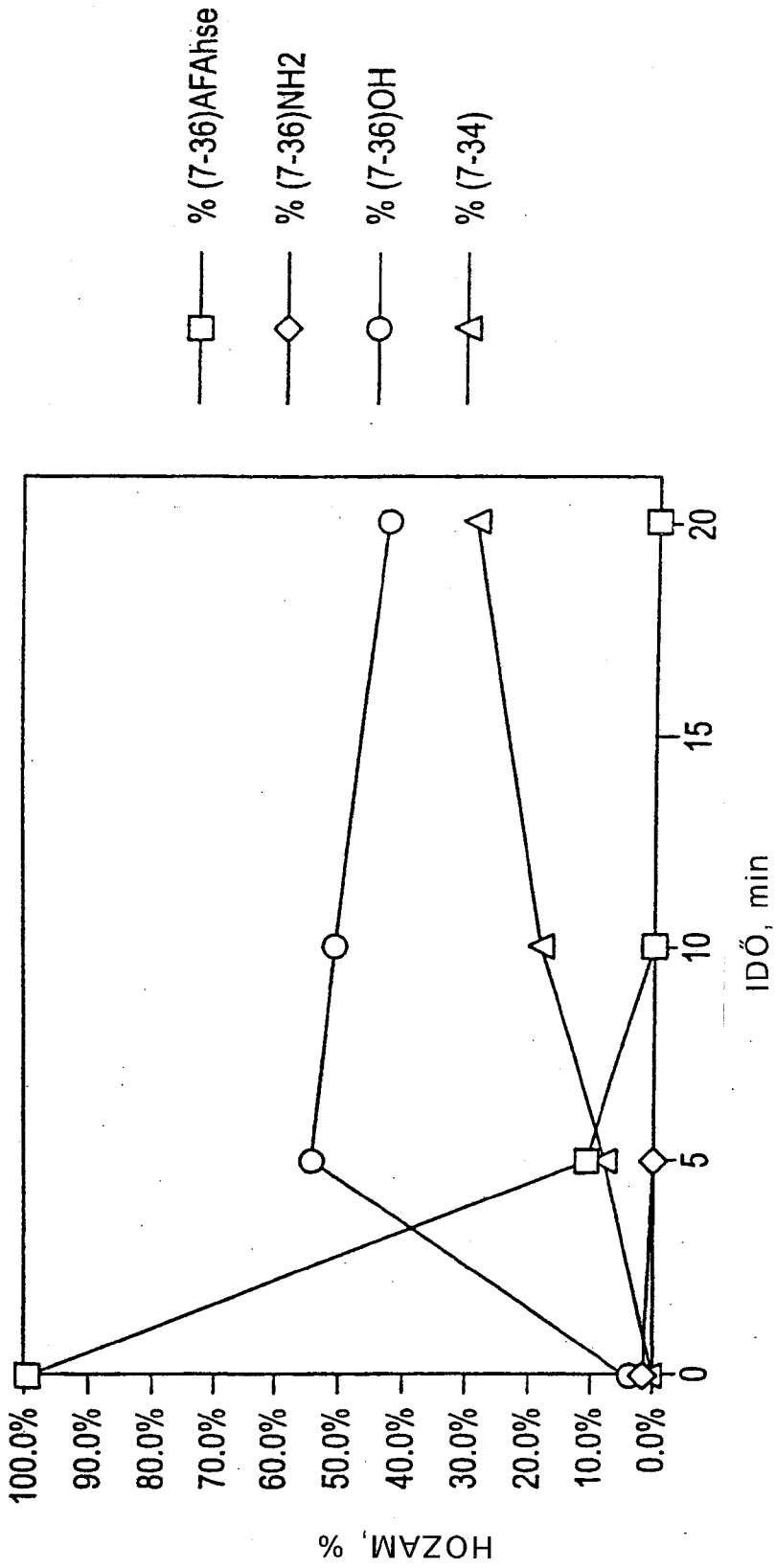
helyett a meghatalmazott:

**DANUBIA**  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
Dr. Palágyi-Tivadar  
szabadalmi ügyvivő

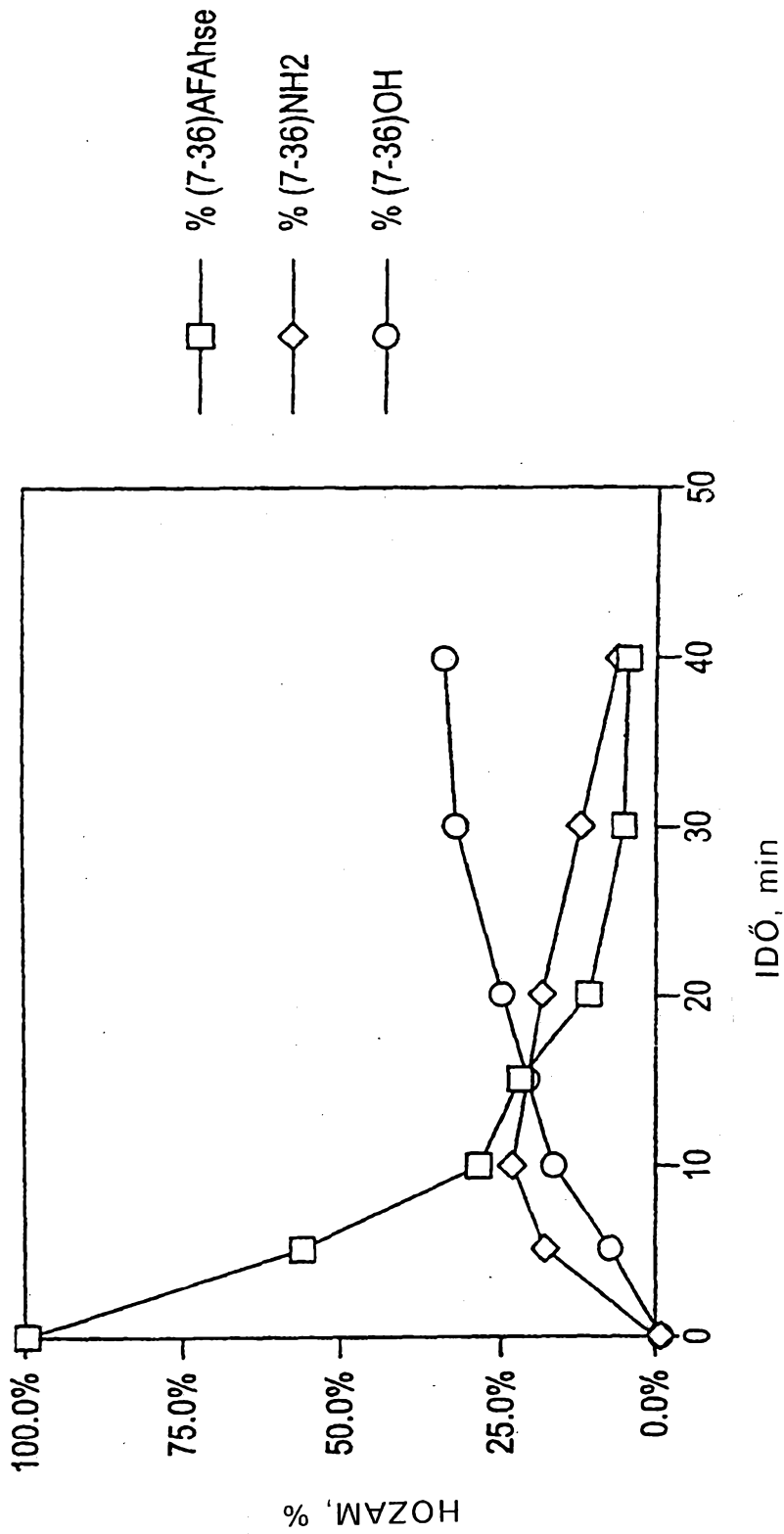
44 + 7 = 51 oldal

DTB

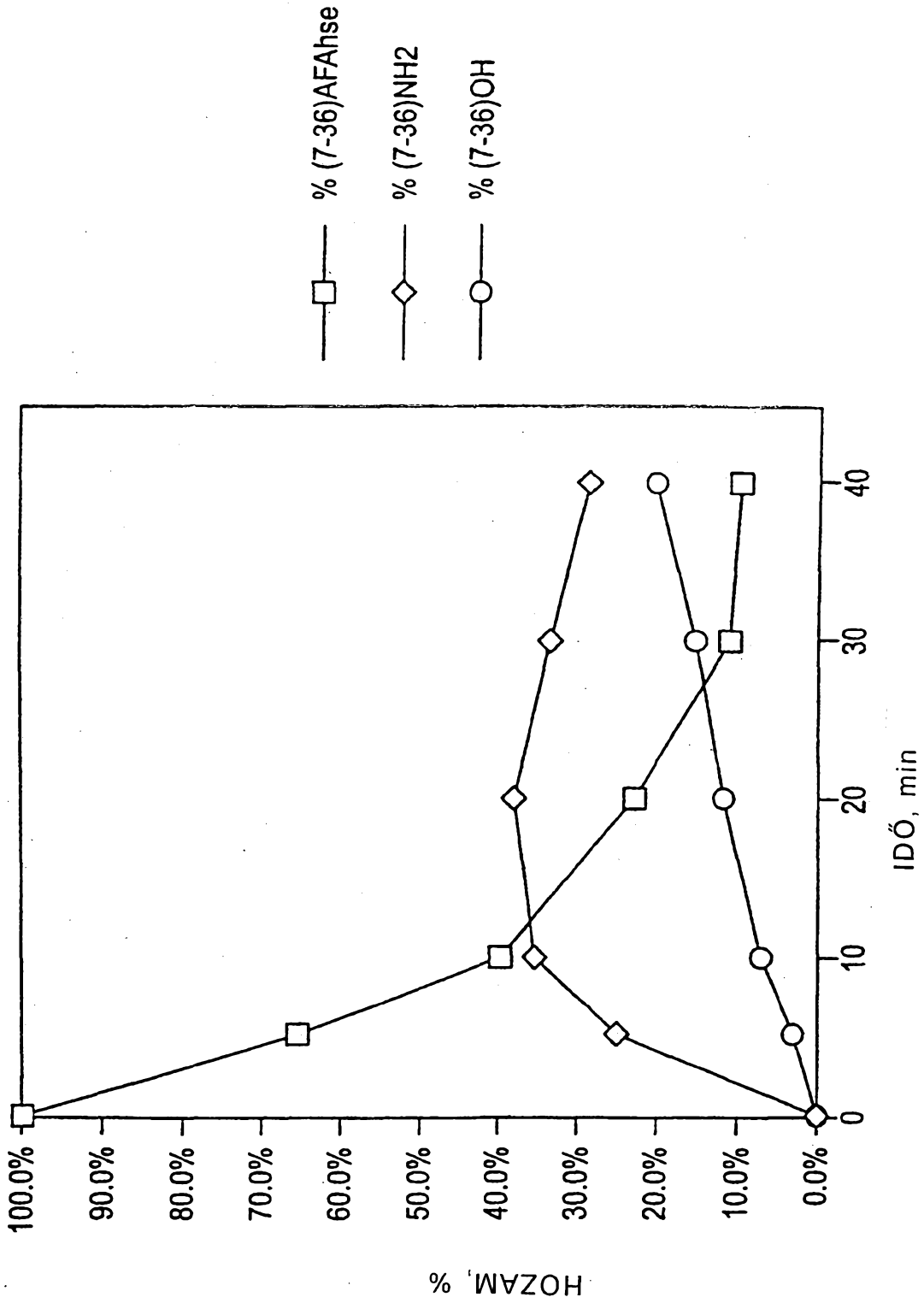
2001. 10. 18.



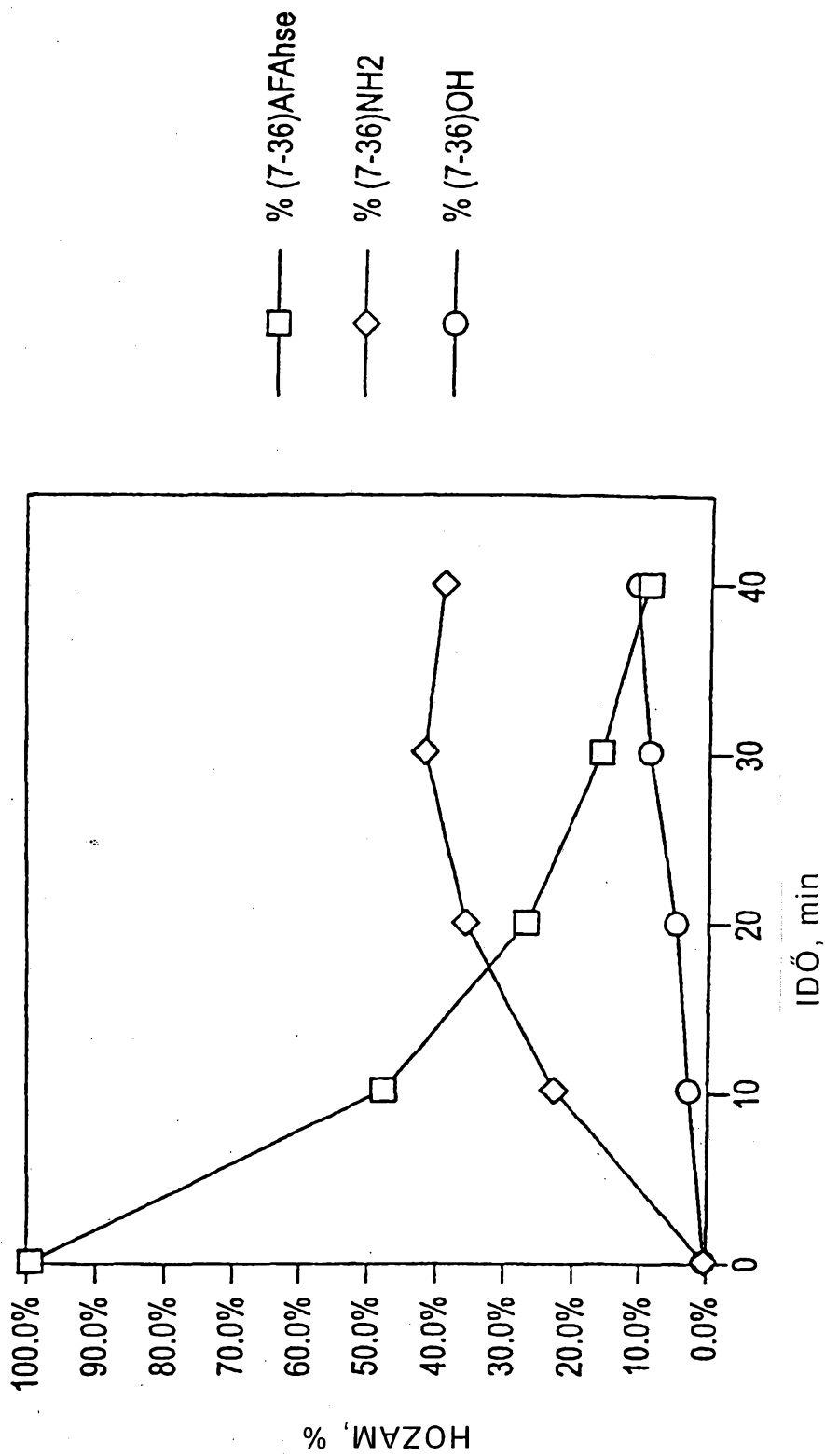
1. ábra



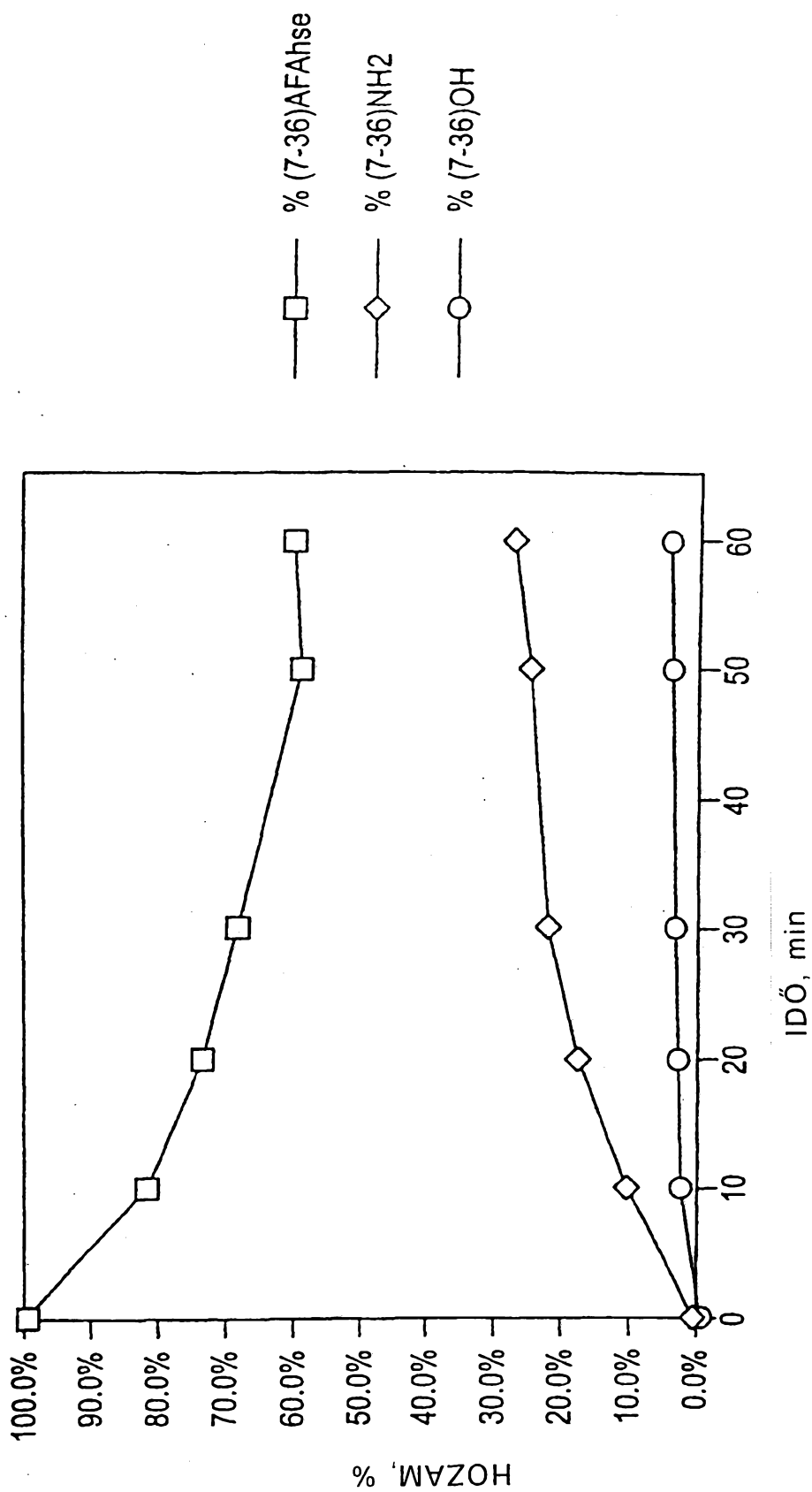
2. ábra



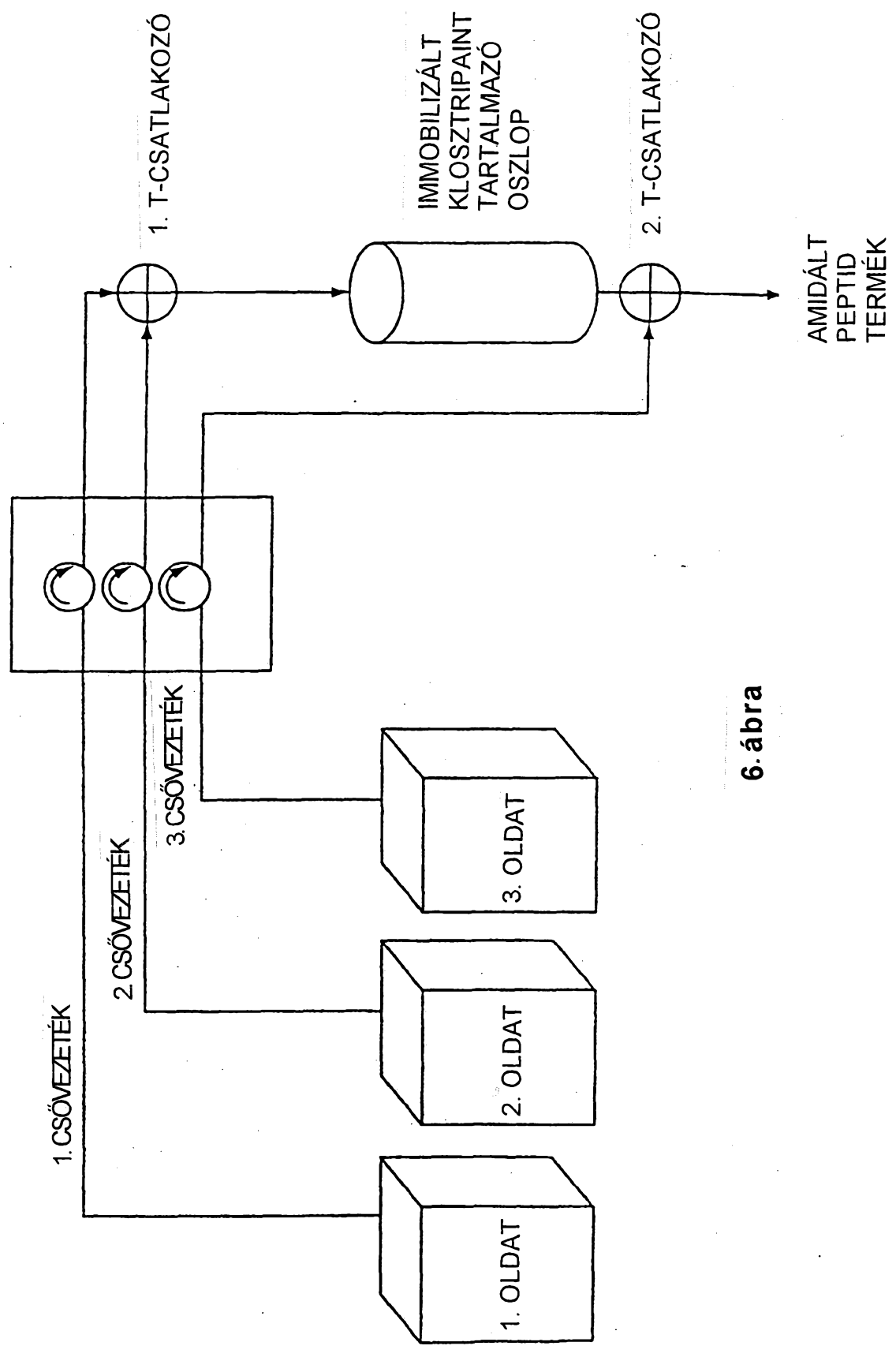
3. ábra



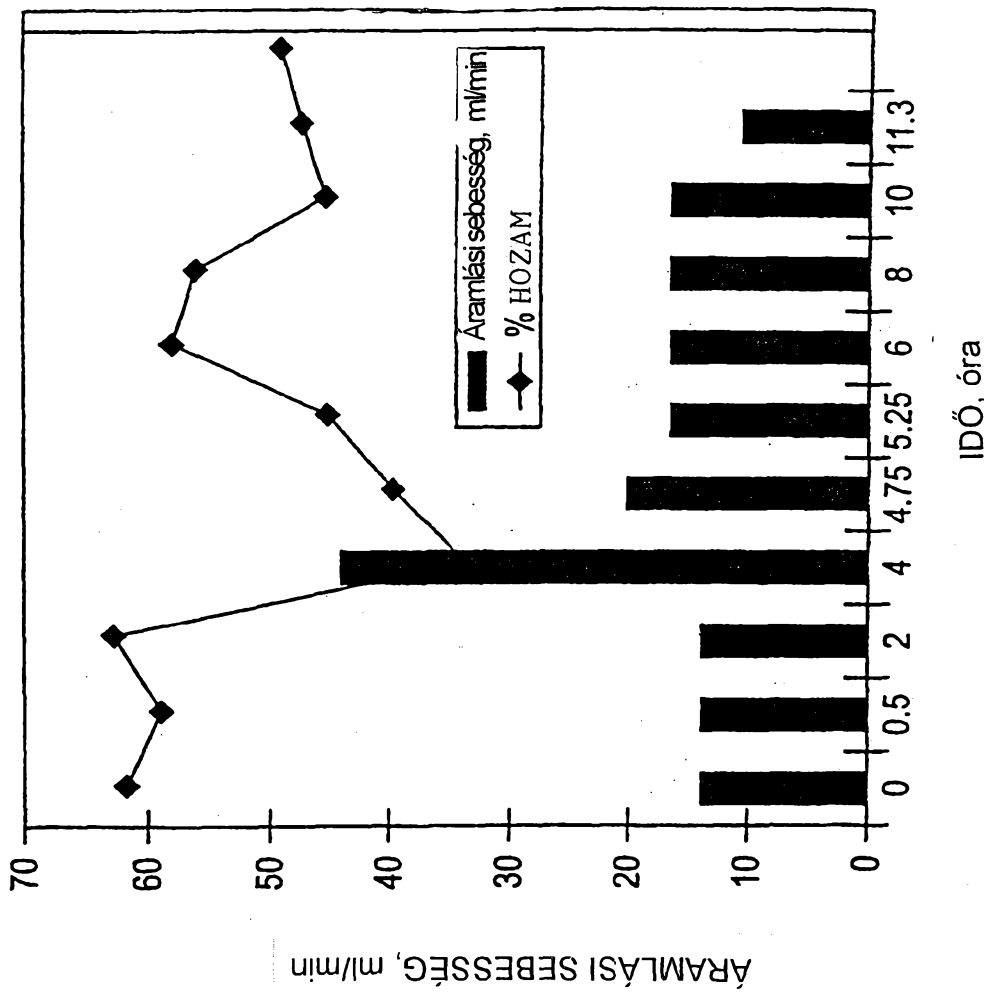
4. ábra



5. ábra



6. ábra



7. ábra