



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **250 932 A1**
 4(51) C 07 H 21/04
 C 12 N 15/00
 C 12 P 21/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 H / 292 266 8

(22) 08.07.86

(44) 28.10.87

(71) Martin-Luther-Universität, Sektion Chemie, Weinbergweg 16, Halle, 4050, DD

 (72) Hoffmann, Siegfried, Dr. Dipl.-Chem.; Günther, Eckhard, Dr. Dipl.-Chem.; Bärwolff, Dieter, Dr. Dipl.-Chem.;
 Teppke, Manfred, Dr. Dipl.-Chem.; Barth, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Oligodesoxyribonucleotiden zur Casomorphinexpression

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Oligodesoxyribonucleotiden der allgemeinen Formel 1, die in pro- und eukaryotischen Vektoren insertions- und clonierungsfähig sind und die Expression von Casomorphinen codieren.

1 Oligodesoxyribonucleotid-Doppelstränge:

Restriktions-	Met-	Casomorphin-	Stop-	Restriktions-
schnitt		Codes		schnitt

Das Ziel der Erfindung besteht in der chemischen Synthese von doppelsträngigen Oligodesoxyribonucleotiden, die aufgrund ihrer spezifischen Strang-, Code- und Leserastergestaltung direkt in pro- und eukaryotischen Vektoren insertions- und clonierungsfähig sind und innerhalb von Fusionsproteinen die Expression von Casomorphinen gestatten. Erfindungsgemäß werden die neuen doppelsträngigen Oligodesoxyribonucleotide mit Casomorphininformationen erhalten durch eine trägergestützte Phosphoramiditsynthese des codierenden und nicht codierenden Oligodesoxyribonucleotidstrangs und ihre anschließende Hybridisierung zu in pro- und eukaryotischen Vektoren unmittelbar insertions-, clonierungs- und innerhalb von Fusionsproteininformationen expressionsfähigen Casomorphingenen.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Oligodesoxyribonucleotiden zur Casomorphinexpression, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Oligodesoxyribonucleotidstränge der allgemeinen Formel 1,

1

Restriktions- schnitt	Met-	Casomorphin- Codes	Stop-	Restriktions- schnitt
--------------------------	------	-----------------------	-------	--------------------------

wobei die Restriktionsenzymkennungsgebiete mit 5'- bzw. 3'-überstehenden cohesiven bzw. glatten Enden für den in Leserichtung (Pfeil) initialen Restriktionsschnitt gegebenenfalls 1-2 zusätzliche Desoxyribonucleotidpaarungen zur

Justierung des Leserasters enthalten, der Met-Code mit $\begin{smallmatrix} 5'-ATG-3' \\ 3'-TAC-5' \end{smallmatrix}$ als Codierung der späteren

BrCN-Spaltstellen der Fusionsproteine eingefügt ist, die Casomorphin-Codes durch die folgenden Gensequenzen — einschließlich der infolge Code-Degeneration außerdem verwendungsfähigen Condons — repräsentiert werden:

Rinder- β -Casomorphin-5(b-CM-5):	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
Prokaryoten-Expression (E. coli):	5'-TAC CCG TTC CCG GGT-3' 3'-ATG GGC AAG GGC CCA-5'
Eukaryoten-Expression (Hefe):	5'-TAC CCA TTC CCA GGT-3' 3'-ATG GGT AAG GGT CCA-5'
Human- β -Casomorphin-5 (h-CM-5):	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu
Prokaryoten-Expression (E. coli):	5'-TAC CCG TTC GTT GAA-3' 3'-ATG GGC AAG CAA CTT-5'
Eukaryoten-Expression (Hefe):	5'-TAC CCA TTC GTT GAA-3' 3'-ATG GGT AAG CAA CTT-5'
Human- β -Casomorphin-5' (h-CM-5'):	Tyr-Pro-Val-Pro-Glu
Prokaryoten-Expression (E. coli):	5'-TAC CCG GTT CCG GAA-3' 3'-ATG GGC CAA GGC CTT-5'
Eukaryoten-Expression (Hefe):	5'-TAC CCA GTT CCA GAA-3' 3'-ATG GGT CAA GGT CTT-5'

und als Stop-Code(s) 1-2 Codons der folgenden drei Triplets

5'-TAA TAG TGA-3' Verwendung finden,
3'-ATT ATC ACT-5'

durch trägergestützte Phosphoramiditsynthese hergestellt und anschließend hybridisiert werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Oligodesoxyribonucleotiden der allgemeinen Formel 1, die in pro- und eukaryotischen Vektoren insertions- und clonierungsfähig sind und die Expression von Casomorphinen codieren.

1 Oligodesoxyribonucleotid-Doppelstränge:

Restriktions- schnitt	Met-	Casomorphin- Codes	Stop-	Restriktions- schnitt
--------------------------	------	-----------------------	-------	--------------------------

→

Pfeil: Leserichtung

Restriktionsschnitt: Restriktionsenzymkennungsbereiche mit 5'- bzw. 3'-überstehenden cohesiven bzw. glatten Enden, für den in Leserichtung initialen Restriktionsschnitt gegebenenfalls unter Einbeziehung von 1-2 zusätzlichen Desoxyribonucleotidpaarungen zur Justierung des Leserasters.

Met-Code: 5'-ATG-3' als Codierung der späteren BrCN-3'-TAC-5' Spaltenstellen der Fusionsproteine

Casomorphin-Codes:

Rinder- β -Casomorphin-5 (b-CM-5):	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
Prokaryoten-Expression (E. coli):	5'-TAC CCG TTC CCG GGT-3' 3'-ATG GGC AAG GGC CCA-5'
Eukaryoten-Expression (Hefe):	5'-TAC CCA TTC CCA GGT-3' 3'-ATG GGT AAG GGT CCA-5'
Human- β -Casomorphin-5 (h-CM-5):	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu
Prokaryoten-Expression (E. Coli):	5'-TAC CCG TTC GTT GAA-3' 3'-ATG GGC AAG CAA CTT-5'
Eukaryoten-Expression (Hefe):	5'-TAC CCA TTC GTT GAA-3' 3'-ATG GGT AAG CAA CTT-5'
Human- β -Casomorphin-5' (h-CM-5'):	Tyr-Pro-Val-Pro-Glu
Prokaryoten-Expression (E. coli):	5'-TAC CCG GTT CCG GAA-3' 3'-ATG GGC CAA GGC CTT-5'
Eukaryoten-Expression (Hefe):	5'-TAC CCA GTT CCA GAA-3' 3'-ATG GGT CAA GGT CTT-5'

Stopp-Code(s): 5'-TAA TAG TGA-3' Verwendung von 1-2
3'-ATT ATC ACT-5' Triplets

Sämtliche Casomorphin-Codes einschließlich der infolge Code-Degeneration anstelle der oben aufgeführten Triplets verwendungsfähigen Codes.

Die Verbindungen besitzen biologisches und technisches Interesse, da sie als Passagier-DNA in pro- und eukaryotischen Vektoren zur Expression gebracht, Casomorphine mit neuroendocriner, cardiovasculärer, cardiotoner und nahrungsverwertungsbessernder Wirksamkeit liefern. Die insertions-, clonierungs- und expressionsfähigen Casomorphingene der allgemeinen Formel 1 können mit Vorteil Verwendung finden zur Expression der Casomorphincodes in Fusionsproteinen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Casomorphin-Typ-Peptide selbst sind bisher als Teilsequenzen der entsprechenden β -Casein-Vorläuferproteine bekannt. Lediglich das b-CM-5 wurde bisher peptidsynthetisch hergestellt.

Die erfindungsgemäß synthetisierten Verbindungen dagegen sind neu. Zur Herstellung von Nucleinsäuresequenzen sind verschiedene Verfahren bekannt, so daß Phosphodiester-, das Phosphotriester- und das Phosphitverfahren. Die modernste Spielart des letzteren ist das Phosphoramiditverfahren (H. G. Gassen und A. Lang, Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments — a laboratory manual, Verlag Chemie, Weinheim 1982). bisher sind jedoch keine in pro- und eukaryotischen Vektoren insertions-, clonierungs- und expressionsfähigen Casomorphingene bekannt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der chemischen Synthese von doppelsträngigen Oligodesoxyribonucleotiden, die aufgrund ihrer spezifischen Strang-, Code- und Leserastergestaltung in pro- und eukaryotischen Vektoren insertions-, clonierungs- und expressionsfähig sind. Die Expression der Casomorphincodes findet dabei innerhalb von Fusionsproteinen statt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren nach dem entsprechende Oligodesoxyribonucleotidstränge herstellbar sind, die als hybridisierte Doppelstränge aufgrund ihrer spezifischen Strang-, Code- und Leserastergestaltung unmittelbar in pro- und eukaryotischen Vektoren insertions- und clonierungsfähig sind und dort Casomorphinexpressionen codieren.

Erfindungsgemäß werden die Oligodesoxyribonucleotidstränge hergestellt durch trägergestützte Phosphoramiditsynthese. Die Hybridisierungen zu insertions-, clonierungs- und expressionsfähigen Casomorphingen-Doppelsträngen werden nach herkömmlichen Techniken durchgeführt. (T. Maniatis et al., Molecular cloning — a laboratory manual, Cold Spring Harbor, 1982 sowie B. Lewin in Gene expression Vol. 2/Wiley Interscience 1980).

Die Auswahl der Casomorphininformations-Triplets erfolgt nach den Expressionsstrategien der zugrundeliegenden pro- und eukaryotischen Systeme (J. L. Bennetzen et al. J. Biol. Chem. 257 [1982] 3026).

Die chemisch synthetisierten Casomorphingene sind aufgrund ihrer cohesiven bzw. glatten Restriktionsschnitte unmittelbar insertions-, clonierungs- und expressionsfähig in pro- und eukaryotischen Vektoren. Abhängig von der Spezifik der jeweiligen Vektoren sichern 0-2 zusätzliche Desoxyribonucleotidpaarungen im Übergang der in Leserichtung initialen Restriktionsschnitte zu den Met-Startcodes die Justierung der Leseraster.

Die den Casomorphininformationen, den eigentlichen Casomorphingenen, vorgeschalteten Met-Start-Informationen gewährleisten die nachträgliche Abspaltung der Casomorphininformationen aus den Fusionsproteinen, die den Casomorphinen nachgeschalteten Stop-Signale die ordnungsgemäßen Terminationen.

Die Freisetzung der Casomorphininformationen aus den (in eukaryotischen Systemen ausgeschleusten) Fusionsproteinen liefert die neuroendocrin, ardiovasculär, cardioton und verbessernd auf die Nahrungsverwertung wirksamen Casomorphinpeptide.

Die direkten chemischen Synthesen dieser in pro- und eukaryotischen Vektoren unmittelbar einbettungs-, clonierungs- und expressionsfähigen Casomorphingene sind — wie die Casomorphingene selbst — neu.

Ausführungsbeispiele

Synthese der beiden Oligodesoxyribonukleotidstränge des h-CM-5-Gens:

28mer: nicht codierender Strang

26mer: codierender Strang

	EcoRI	Met	Tyr	Pro	Phe	Val	Glu	Stop	Clal
28mer: 5'-	AATTC	ATG	TAC	CCG	TTC	GTT	GAA	TAA	AT-3'
26mer: 3'-	G	TAC	ATG	GGC	AAG	CAA	CTT	ATT	TAGC-5'
			↑						
			RsaI						

Die Codoauswahl erfolgte entsprechend der natürlichen Codonverwendung in hoch exprimierten E.coli-Genen als Beispiel für ein prokaryotisches Expressionssystem. Die beiden Restriktionsschnitte EcoRI und ClaI ergeben sich aus den Anforderungen des verwendeten prokaryotischen Vektors. Eine Justierung des Leserasters durch zusätzliche spacer-Desoxyribonucleotide wurde nicht benötigt.

Zur Realisierung der vorgegebenen Genstruktur wurden das obige 26er und 28er Oligodesoxyribonucleotid synthetisiert. Zur Synthese wurde das Phosphoramiditverfahren an fester Phase in 3'-5'-Richtung gewählt. Der Aufbau der Oligodesoxyribonucleotide fand in einer Reaktionsspritze statt.

Die 2'-Desoxynucleoside wurden nach bekannten Verfahren in 5'-Position dimethoxytrityliert, im Basenteil durch N-Acylierung geschützt und in die 3'-Methyl-morpholino-phosphoramidite überführt. Diese kamen frisch nach Chromatographie an Kieselgel und Fällung (n-Hexan/-78°C) zum Einsatz.

Entsprechend Schema 1 erfolgte der schrittweise Aufbau bei einer Cyclisdauer von 20–30 min. Als Träger gelangte Fractosil 500 zum Einsatz. Die Fixierung der Startnucleoside erfolgte mit 3-Aminopropyltriethoxysilan und einem Succinylspacer. Es wurde eine Nucleosidbeladung von 40–45 µmol/g Träger erreicht.

Ausgegangen wurde von 50–70 mg derivatisiertem Träger, entsprechend einer Ansatzgröße von 2–3 µmol. Nach einem Null-Capping und der Detritylierung des Startnucleosids begann die Kettenverlängerung unter Verwendung eines 10fachen Amidit-Überschusses.

Schema 1

1. Waschen	3 × 1,5 ml Acetonitril	0,5 min
2. Capping	DMAP/THF/Collidin 0,2 ml Ac ₂ O/THF	1 min
3. Waschen	3 × 1,0 ml Acetonitril	
	2 × 1,0 ml Dichlorethan	2 min
4. Detritylierung	3% Trichloressigsäure	
	3 × 1,5 ml in 1,2-Dichlorethan	max. 2 min
5. Waschen	3 × 1,5 ml 1,2-Dichlorethan	
	6 × 1–1,5 ml Acetonitril	2 min
6. Kondensation	0,125 ml Morpholid (0,5 molar in Acetonitril)	
	0,2 ml Tetrazol (0,5 molar in Acetonitril)	10–20 min
7. Waschen	2 × 1,5 ml Acetonitril	0,5 min
8. Oxidation	I ₂ /Collidin/THF/H ₂ O 0,5–1 ml	1 min
Gesamtdauer:		20–30 min

Nach Beendigung der Synthese durch letzte Detritylierung und Waschen mit Acetonitril verblieb der Träger mit dem gebundenen Oligodesoxyribonucleotid in der Spritze und wurde im Verlauf von 1 h mit Thiophenol/Triethylamin/Dioxan (1/1/2) entmethyliert. Anschließend wurde sorgfältig mit Methanol und wenig Triethylamin, sodann noch mit Diethylether gewaschen. Unter Verschluss der Kanüle des Spritzenreaktors wurde unter Zusatz von 1 ml 20%iger NH₃-Lösung das Oligodesoxyribonucleotid im Verlauf von 2–3 h vom Träger abgespalten. Die Lösung wurde unter Nachspülung mit NH₃-Lösung bis zu einem Gesamtvolumen von 3–4 ml in ein Bombenrohr überführt, mit NH₃-Gas aufkonzentriert, abgeschmolzen und bei 60°C über Nacht belassen. Danach wurde die Lösung in einen Spitzkolben überführt und vorsichtig zur Trockne eingengt. Schließlich wurde mit 150 µl Wasser/50 µl Methanol aufgenommen, vom evtl. Niederschlag abzentrifugiert und an Kieselgel-Platten im System i-Propanol/NH₃/H₂O (55/35/10) über Nacht chromatographiert. Die unter UV-aktive Hauptbande wurde isoliert und mit 6–8 ml H₂O eluiert. (Konz.-Bestimmung anhand der UV-Absorption).

Das lyophilisierte Material wurde in herkömmlicher Weise mit (γ-³²P)ATP und T4-Kinase 5'-endmarkiert und in 20%igem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Einheitlichkeit der Proben wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die reinen 5'-markierten Einzelstränge wurden nach einem modifizierten Maxam-Gilbert-Verfahren an CCS-Papier sequenziert.

Die autoradiographisch erhaltenen Bandenmuster entsprechen den Erwartungen.

Die Hybridisierung der beiden Stränge zum einbettungsfähigen Gen erfolgte nach herkömmlichen Techniken.

Auf diese Weise wurde beispielsweise das 26mer bei einer Gesamtsynthesedauer von 13 h in einer Gesamtausbeute von 11 % (91,5% Cyclusaussbeute) und das 28mer in 14 h mit 3% Gesamtausbeute erhalten.