

5665/89

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

37211

Eljárás fúziós proteinek szelektív hasítására

HOECHST AG., Frankfurt am Main, Német Szövetségi Köztársaság

A bejelentés napja: 1989. 11. 03.

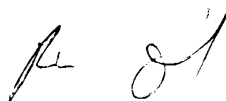
Elsőbbsége: 1988. 11. 03. (P 38 37 271.1)

-53677-

Német Szövetségi Köztársaság

## K I V O N A T

Polipeptideket vagy proteineket - például inzulin-származékokat vagy dez-B<sup>30</sup>-inzulin-származékokat, így humán-inzulint illetve dez-B<sup>30</sup>-humán-inzulint állítanak elő különleges, géntechnológiai úton kapható fúziós proteinek enzimes hasítása útján. A kiindulási fúziós protein molekulájában peptidszerű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor maradékát tartalmazza. Enzimként tripszin jellegű endopeptidázt alkalmaznak. A kiindulási anyagként alkalmazott különleges fúziós protein előnyösen feldolgozható reakcióterméket biztosít; adott esetben a feldolgozás kristályosítással végezhető el.



37211

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda

A

5664/89

-53677

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

Nb 05 CAP 21/06

ELJÁRÁS FÚZIÓS PROTEINEK SZELEKTÍV HASÍTÁSÁRA

Hoechst AG., Frankfurt am Main, NÉMET SZÖVETSÉGI KÖZTÁRSASÁG

Feltalálók: Dr. VÉRTESY László, Eggenstein / Tübingen.

Dr. SAUBER Klaus, Bad Soden am Taunus.

Dr. EHLERS Eberhard, Hofheim / Taunus.

NÉMET SZÖVETSÉGI KÖZTÁRSASÁG

A bejelentés napja: 1989. 11. 03.

Elsőbbsége: 1988. 11. 03. ( 3837271.1)

NÉMET SZÖVETSÉGI KÖZTÁRSASÁG

67654-1023 To/Ze

A találmány tárgya eljárás fúziós proteinek szelektív hasítására polipeptidek vagy proteinek előállítása céljából. A fúziós protein hasítása tripszin jellegű endopeptidáz enzimmel történik.

Polipeptidek és proteinek előállításában a rekombináns DNS-technológia fokozódó jelentősége a termékek feldúsítását és tisztítását célzó olyan új eljárások kifejlesztését igényli, amelyek jól illeszkednek az (új) kiindulási anyagokhoz.

A Diabetes mellitus kezelésében alkalmazható humán inzulin félszintetikus, úgynevezett kétlépcsős előállítása során a B<sup>30</sup> helyén lévő aminosavészter kicserélése (sertésinzulin: Ala; humán inzulin: Thr) két egymásra következő, elkülönült reakciólépésben történik. Az első lépésben a sertésinzulin B<sup>30</sup>-Ala-csoportját tripszinhez hasonló proteáz enzimmel lehasítják, és a második lépésben treonin-származékot, például treonin-terc-butilésztert (ThrOBu<sup>t</sup>) kapcsolnak a lánchoz, szintén tripszin jellegű enzim jelenlétében. A két reakciólépés enzimjeként például K. Morihara et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 92, No. 2, 396-402 (1980)) *Achromobacter* I-proteázt javasolnak, egy úgynevezett endopeptidázt, amely a peptidláncot fajlagosan a lizin aminosav karboxiloldalán hasítja és adott esetben újra egyesíti.

Az alanin lehasítása és a treonin-származék kapcsolása után a treonin-származékkal együtt bevitt védőcsoportokat lehasítják, hogy a védőcsoportmentes humán inzulinhoz jussanak; erre több módszer ismert, a trifluor-ecetsavval végzett hasítást többnyire előnyben részesítik.

A sertésinzulin B<sup>30</sup>-Ala-csoportjának a lehasítása és a teroninszármazék hozzákapcsolása egyetlenegy reakciólépésben is elvégezhető ("egylépcsős eljárás"). Ez esetben is enzim jelenlétében kell végezni a reagáltatást, és enzimként gyakorlatilag csak tripszin és tripszinhez hasonló endopeptidázok jöhetnek számításba (lásd például az 56 951 számú európai szabadalmi leírás). Elvégzett "transzpeptidálás" után a treonin-származékkal együtt bevitt védőcsoportokat le kell hasítani.

Kénzekfekvő okokból kísérletek folytak, hogy humáninzulin előállításánál a természetes kiindulási anyagként felhasznált sertésinzulint valami mással helyettesítsék, és ez a géntechnológia fejlődésének köszönhetően - legalább részben - sikerült is. A 89 007 számú európai szabadalmi leírás olyan eljárást ismertet, amely szerint inzulin-származékok, különösen humán inzulin állítható elő géntechnológiai úton nyert preproinzulin-analógokból; az eljárás szerint a preproinzulin-analógot a megfelelő inzulin izoelektromos pontja alatti pH-érték mellett tripszin vagy tripszin jellegű endopeptidáz segítségével adott esetben védőcsoportokat tartalmazó aminosav-észterrel reagáltatják (transzpeptidálás), majd az észtercsoportot és az adott esetben jelenlévő védőcsoportokat lehasítják. Humán-inzulin előállítása esetén aminosav-származékként előnyösen Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBU<sup>t</sup>-t alkalmaznak.

Kiindulási preproinzulin-analóggként az említett európai szabadalmi leírás szerint olyan inzulin-származékot alkalmaznak, ahol a proinzulin N-terminálisán lizin vagy arginin vagy acil-aminoacil-származékuk van jelen egy pre-szekvencia karboxilvégeként; a leírás szerint a preproinzulin-analógok az (I) álta-

lános képletnek felelnek meg, amelyben

Y jelentése Lys vagy Arg, és

$R^1$  jelentése hidrogénatom, L-aminosav-csoport vagy az alábbiakban leírt X képletű peptidcsoport.

X-ként bármely olyan peptid szerepelhet, amely jelzőszekvenciaként alkalmas. A proinzulin-rész minden olyan termék lehet, amely természetes proinzulinban vagy ismert nukleotidkapcsoló módszerrel szintetikusán módosított proinzulinban kódolható. Rövidített C-peptid-szegmenssel rendelkező analóg peproinzulinok (mint amilyen például a szarvasmarha C-peptidje a sertés C-peptidjével összehasonlítva) szintén alkalmazhatók az eljárásban. humán preproinzulin-analógok szintén alkalmazhatók.

A C-peptid szerkezetében az a fontos, hogy bázikus Y L-aminosavon ( $Y = \text{L-Arg}$  vagy  $\text{L-Lys}$ ) keresztül az intulin A-láncának glicinjével van összekapcsolva, azaz hogy  $Y-(AS)_n-Y$  képletű szerkezet van jelen, ahol AS bármely kódolható aminosav lehet és n értéke 0 és 35 közötti egész szám. Az aminosavésztert és/vagy szabad aminocsoportot hordozó származékát úgy is lehet választani, hogy a keletkező inzulinanalóg szekvenciája nem természetes szekvencia.

Az enzimikus reakció során az  $R^1-Y^{B0}$  képletű pre-rész, valamint az  $Y^{A0}-B^{30}$  rész lehasad, és a  $B^{30}$  helyzetbe a megfelelő aminosav-származék kerül.

Elképzelhető, hogy a megfelelő aminosav-származék adagolása nélkül dez- $B^{30}$ -inzulinok is keletkezhetnek.

Bár az eljárás kiindulási állati eredetű inzulintól való függetlensége nagy előny, a reakciótermékek oszlopkromatográfiás

tisztításának szükségessége (amely gyakran lényeges veszteséggel jár) bizonyos hátrányt jelent. Az oszlopkromatográfiás tisztításra azért van szükség, mert az enzimes reakció során gyakran olyan hasítási termékek keletkeznek, amelyek a kívánt inzulintól (származékától) főleg a hasonló lánchossz miatt csak nehéne választhatók el.

Feladatul az említett 89 007 számú európai szabadalmi leírásban szereplő eljárás olyan módosítását tűztük ki, amely polipeptidek vagy proteinek - előnyösen dez-B<sup>30</sup>-inzulinok vagy humán inzulin - kinyerését teszi lehetővé, mimellett a kapott termék könnyebben, kevesebb anyagvesztéssel tisztítható.

Ezt a feladatot különleges fúziós proteinek tripszin jellegű endopeptidázzal végzett hasításával oldottuk meg. A különleges fúziós proteinek a (II) általános képletnek felelnek meg, ahol

R jelentése  $-(AS)_o$ -(peptid jellegű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor) képletű csoport, amelyben AS = Lys kivételével bármely genetikailag kódolható aminosav, o = 0 és 200 közötti, előnyösen 5 és 100 közötti, különösen előnyösen 10-től 12-ig terjedő egész szám, és (peptid jellegű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor) = az irodalomból ismert  $\alpha$ -amiláz-inhibitorok maradéka,

P jelentése a kívánt polipeptid vagy protein,

R<sup>2</sup> jelentése  $-(AS)_p$  képletű csoport, ahol AS jelentése a fenti (kódolható aminosav Lys kivételével) és p értéke 1 és 35, előnyösen 1 - 10, különösen előnyösen 1-től 3-ig terjedő egész szám, és

m értéke 0 vagy 1 n.

A találmány tárgya tehát eljárás polipeptidek vagy proteinek előállítására fúziós protein tripszin jelleű endopeptidázzal végzett hasítása útján. Az eljárásra jellemző, hogy fúziós proteinként egy (II) általános képletű vegyületet alkalmazunk.

A fenti enzimes reakció során keletkező polipeptidek vagy proteinek (előnyösen inzulin-származékok, így például dez-B<sup>30</sup>-inzulinok vagy humán-inzulin) az  $\alpha$ -amiláz-inhibitor-maradék miatt különösen könnyen tisztíthatók. A vegyületek vizes közegben jól oldódnak, könnyen kristályosodnak és affinitásuk van  $\alpha$ -amilázokhoz, ami az elválasztásukhoz használható fel. A dez-B<sup>30</sup>-inzulin-származékok például kevesebb ráfordítással és kevesebb veszteséggel tisztíthatók, mint a 89 007 számú európai szabadalmi leírás szerinti eljárás termékei. Kedvező esetekben a reakcióelegy feldolgozása csupán kristályosítással, azaz oszlopkromatográfiás tisztítás nélkül végezhető el. Meglepő, hogy az irodalomból ismert  $\alpha$ -amiláz-inhibitorok maradékát a találmány szerinti reakció során a tripszin jelleű endopeptidáz nem hasítja; ez azért van, mert az  $\alpha$ -amiláz-inhibitorok peptidláncában olyan lizilcsoport van, amelynél (ellentétben például a dez-B<sup>30</sup>-inzulinok kiindulási anyagainak A<sup>0</sup>, B<sup>0</sup> és B<sup>29</sup> helyzetében lévő lizilcsoportokkal) hasítás nem következik be. Ha ott történne hasítás, olyan töredékek keletkeznének, amelyek a dez-B<sup>30</sup>-inzulinok mellől csak igen nehezen távolíthatók el.

Az AS csoportként számításba jöhető, genetikailag kódolható aminosavak (Lys kivételével) az alábbiak: Gly, Ala, Ser, Ihr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, His, Tyr, Phe, Trp, Pro (semleges aminosavak aláhúzva).

A P csoport előnyösen a humán-, sertés- vagy szarvasmarha-inzulin, főleg a humán- és sertés-inzulin A- és B-peptidláncot képvisel.

Az  $R^2$  csoport előnyösen csak Ala- vagy Thr-aminosavból, főleg csak Thr-aminosavból áll.

Az R csoport különösen előnyös  $-(AS)_0$ - része az alábbi peptidlánc:

-Gly-Asn-Ser-Asn-Hly-Thr-Ala-Met-Ala-Asn-Phe-.

Az R csoportban szereplő peptid jellegű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor-maradékként gyakorlatilag az irodalomból ismert  $\alpha$ -amiláz-inhibitorok bármelyikének a maradéka jöhet számításba (L. Vértessy et al., Euro. J. Biochem. 141, 505-512 (1984); L. Vértessy D. Tripiet, FEBS-Letters Vol. 185, 187-190 (1985); O. Hoffmann et al., Biol. Chem. Hoppe-Seylers Vol. 366, 1161-1168 (1985); H. Murai et al., J. Biochem. 97, 1129-33 (1985); S. Murao et al., Agric. Biol. Chem. 49, 107-110 (1985) és 49, 793-797 (1985); Japan Kokai 75/77594 (20. Nov. 1974) H. Goto et al.).

Különösen előnyös a (III) képletű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor-maradék.

Különösen előnyös termékek az olyan (II) általános képletű vegyületek, amelyekben P a humán- vagy sertés-inzulin peptidszekvenciáját képviseli,  $R^2$  jelentése Thr és R jelentése a (III) általános képletű peptid-szekvencia.

A (II) általános képletű fúziós proteinek előállítására mikroorganizmusokban történik általánosan ismert módszerek segítségével; a kívánt polipeptid vagy protein aminosav-szekvenciája elé idegen protein ( $\alpha$ -amiláz-inhibitor) szekvenciáját kapcsoljuk (F.A.O. Harston, Biochem. J. 240, 1-12 (1986)).

Az előnyös preproinzulin-analógok, azaz P helyén a humán-, sertés- vagy szarvasmarha-inzulin A- és B-peptidláncát tartalmazó (II) általános képletű vegyületek géntechnológiai úton, előnyösen a saját, párhuzamosan benyújtott, "Eljárás inzulin-előtermék előállítására Streptomyces-ekben" című szabadalmi bejelentésünk szerint történik. Az inzulin-előterméket, amelyet a mikroorganizmus általában a tenyészközegbe választ ki, előnyösen a tenyészlé szűrletéből nyerjük ki. Azt tapasztaltuk, hogy a (II) általános képletű vegyületek számos tulajdonságokban hasonlóságot mutatnak az  $\alpha$ -amiláz-inhibitorokkal, ami azt jelenti, hogy az amiláz-inhibitorok esetén szokásos elkülönítő és tisztító lépések a fúziós protein-előtermékek, különösen az inzulin-előtermékek kinyerésében használhatók fel.

Az ilyen tisztító lépések például kicsapási reakciók lehetnek sókkal, így konyhasóval vagy ammónium-szulfáttal, savakkal, így metafoszforsavval, tanninnal, triklór-ecetsavval, kénsavval, nehézfémsókkal és egyéb kicsapószerekkel, például polietiléniminnel, bentonittel stb.

Míg géntechnológiai úton nyert proteinek gyakran nemkívánatos oldódási tulajdonságokkal rendelkeznek és ezért nem könnyen dolgozhatók fel, a határozottan oldékony (II) általános képletű vegyületek, így a preproinzulin-analógok például igen elegánsan ultraszűréssel feldúsíthatók, ugyanakkor sómentesíthetők. Az ultraszűrés például a kereskedelmi forgalomban kapható cellulóz-membránok segítségével végezhető el.

A (II) általános képletű előtermékek, például inzulin-előtermékek feldúsításához és tisztításához adszorpciós gyantákat is használhatunk. Az ilyen, polisztirol vagy sztirol/divinil-

benzol kopolimerizát bázisú adszorpciós gyanták a kereskedelem-  
ben kaphatók, például Amberlite XAD (Rohm and Haas, USA),  
Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Corp.) stb.

Az adszorpciós gyanta, például Diaion HP-20 segítségével  
történő protein elválasztást például a 30 38 130 számú német  
szövetségi köztársaságbeli közrebocsátási irat ismerteti. Gén-  
technológiailag nyert proteinek, így inzulin-előtermékek azonban  
adszorpciós gyantával vagy egyáltalán nem, vagy csak nagy vesz-  
teségek árán voltak feldúsíthatók. Ez egyebek között arra vezet-  
hető vissza, hogy a kívánt anyag túl erősen kötődött a hordozó-  
hoz. Meglepő módon azt találtuk, hogy az adszorpciós gyanták  
mégis alkalmazhatók, ha az anyag gyengébb, kevésbé erőteljes  
kötődéséről gondoskodunk. A hordozó ilyen jellegű inaktiválása  
például a hordozó kezelésével és/vagy az elválasztandó anyaghoz  
adott alkalmas adalék segítségével történhet. A hordozó kezelésé-  
nek példaként a vizes-szerves oldószerrel (2-70 %, előnyösen  
5-30 % oldószer) végzett mosását említjük meg. Oldószerként  
vízzel elegyedő oldószer, előnyösen rövid szénláncú alkoholok,  
továbbá aceton jöhet számításba. A hordozót vizes detergens-  
-oldattal, így 0,02 - 3 %-os, előnyösen 0,1 - 1 %-os Triton-X-100-  
-oldattal is moshatjuk, bár számos egyéb detergens is alkalmas e  
célra.

Az elválasztandó anyagot tartalmazó oldathoz és/vagy az  
eluáló folyadékhoz adalékot is adhatunk. Adalékként az alábbiakat  
említjük meg: vízzel elegyedő, kis moltömegű szerves oldósze-  
rek, detergensok a fent megadott koncentrációban, továbbá úgyne-  
vezett kaotróp anyagok, például kálium-perklorát (0,1-3 %),  
karbamid (1-8 mólos) vagy guanidinium-hidroklorid.

A kívánt esetben feldúsított, sómentesített fúziós protein előtermékek (például inzulin-előtermékek) mind kationcserélő, mind anioncserélő gyantán végzett ioncserés kromatográfiás módszerrel is tisztíthatók. Alkalmas kationcserélő gyanták például SP-Sephadex (Pharmacia, Svédország), CM-cellulóz, S-Sepharose (Pharmacia, Svédország), Fractogel TSK CM (Merck, Darmstadt, NSZK) stb. Alkalmas anioncserélő gyanták például a Fracogel TSK DEAE (Merck, Darmstadt, NSZK), DEAE-cellulóz, DEAE-Sephadex (Pharmacia, Svédország), Q-Sepharose, QAE-Sephadex, QAE-cellulóz stb. Az elválasztás ismert módon vizes oldatban történik. Előnyösnek bizonyult, ha egyes esetekben a vízhez oldódást elősegítő anyagokat és/vagy kaotróp anyagot adunk. Az ilyen adalékok például: 2 - 8 mólos karbamid, betain, rövid szénláncú alkoholok, így metanol, izopropanol, etanol, etilén-glikol, stb. Alkalmas tisztítási módszer továbbá a hidrofób kromatográfia, például fenil-Sepharos segítségével, például biogélen végzett molekulaszűrő kromatográfia, a preparatív nagynyomású folyadék kromatográfia, vagy  $\alpha$ -amiláz-inhibitor elleni antitestekkel preparátl oszlopon végzett kromatográfia.

Az inzulin-előtermék  $\alpha$ -amiláz-inhibitor jellegű tulajdonságai a kristályosítással végzett tisztítást is lehetővé teszik. A kristályosítást az adott izoelektromos pont közelében, vagy savas közegben végezzük adott esetben adalék, így konyhasó segítségével. Vizes oldatból is kristályosíthatunk, olyan adalékkal, amely a kristályosodást elősegíti, például nehézfémionok, mint  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , pikrinsav segítségével.

Igen előnyös továbbá, ha a (II) általános képletű proteinek vagy töredékeik  $\alpha$ -amiláz-gátló tulajdonságaikat használjuk

fel a tisztítás érdekében. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy a géntechnológiai úton nyert proteinek is, ha az inhibitor aminosav-szekvenciáját tartalmazzák, az  $\alpha$ -amilázt komplexképzéssel gátolják. Az inhibitorból és  $\alpha$ -amilázból létrejött komplex a kiindulási komponenseknél nehezebben oldódik, így könnyen elválasztható. Úgy is eljárhatunk, hogy a (II) általános képletű vegyületet hordozóhoz rögzített amiláz segítségével a tenyészléből elválasztjuk, majd a kapott komplexet alkalmas módon, például pH- vagy só-gradiens segítségével szétválasztjuk. Ez előnyös a (II) általános képletű vegyület proteolitikus hidrolizátumának feldolgozása során is. Ez esetben a már nem szükséges inhibitor-töredékét rögzített amiláz segítségével a reakcióelegyből eltávolítjuk. A visszamaradó termék (például a dez-B<sup>30</sup>-humáninzulin) olyan tiszta, hogy mindjárt kristályosítható. A kristályosítás ismert módon történik.

A (II) általános képletű vegyületek enzimhasítása során tisztított előterméket viszünk reakcióba, de csak részlegesen tisztított kiindulási anyagokkal is dolgozhatunk.

A (II) általános képletű vegyület koncentrációja a reakcióelegyben viszonylag széles tartományon belül változtatható. A koncentráció előnyösen 0,02 - 15 t%, különösen előnyösen mintegy 0,05 - 5 t%, a reakcióelegy össztömegére vonatkoztatva.

Tripszin jellegű endopeptidázként olyan endopeptidázok jöhetnek számításba, amelyek az irodalomból tripszin jellegűnek ismertek, azaz olyanok, amelyek bázikus aminosavak karboxil-terminálisán a peptidkötést szelektíve hasítják; erre a már említett 89 007 számú európai szabadalmi leírásban adnak irodalmi

hivatkozást, továbbá olyanok, amelyek szelektíve lizin mögött hasítanak (092 829 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés, illetve a 4 414 332 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Előnyben részesítjük a lizil-endoropeptidázt (nyerhető *Lysobacter* enzymbogenes-ből), amely fajlagosan a lizin bázikus aminosav karboxilvégén hasítja a peptidkötést. Lizil-endoropeptidázra például az alábbi irodalom vonatkozik: P. A. Jeckel et al., *Analytical Biochemistry*, 134. kötet (1983), 347-354. sz. oldal; T. Masaki et al., *Biochim. Biophys. Akad.*, 660. kötet, 44. oldaltól, valamint 51. oldaltól (1981).

A tripszin jellegű endopeptidáz koncentrációját célszerűen a (II) általános képletű fúziós protein tömegének 1/50. - 1/10000 részére, különösen előnyösen 0,5 és 1,5 t%-ra (a fúziós protein tömegére vonatkoztatva) állítjuk be.

A (II) általános képletű vegyületek enzimes hasítását vizes oldatban, adott esetben oldódást elősegítő anyag (például karbamid, izopropanol stb.) jelenlétében, mintegy 5 és 11, előnyösen mintegy 7 és 9,5 közötti pH érték mellett végezzük. A pH-érték beállítására és állandó értéken tartására célszerűen a szokásos puffer rendszerek, például foszfátpuffer, trisz/HCl,  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  valamelyikét alkalmazhatjuk.

Az enzimes hasítást mintegy 1 és 60 °C közötti, előnyösen 15 és 40 °C közötti hőmérsékleten végezzük.

A hasítás általában 0,1 - 2 óra alatt befejeződik, de - a mindenkorai reakciókörülményektől függően - rövidebb vagy hosszabb reakcióidő is adódhat.

Az enzimes hatás befejeztével (amit például kromatográfiás módszerrel állapíthatunk meg) esetleges további, nemkívánatos

hasadást a reakciókörülmények megváltoztatásával ismert módon megállítunk (például a PH-érték megváltoztatásával, lehűtéssel, inhibitorok adagolásával), és a keletkezett dez-B<sup>30</sup>-inzulint ismert módon elkülönítjük. Az elkülönítés történhet az idevonatkozó ismert eljárások szerint kromatográfiásan is, de elvileg a kristályosítással történő elkülönítés is lehetséges, tekintettel arra, hogy a dez-B<sup>30</sup>-inzulin lánchosszúság és így móltömeg vonatkozásában lényegesen különbözik a melléktermékektől.

A transzpeptidálást vizes-szerves közegben (például víz/DMF, víz/BMSO) végezzük, a keverési arány tetszőleges, előnyös az oldószer:víz 1:4 - 1:1 arány. A pH-érték célszerűen 4 és 8 közötti, előnyösen 5 és 6 közötti, és a hőmérséklet 1 - 50 °C, előnyösen 15 - 30 °C.

Az enzimes transzpeptidálás végén (detektálás például HPLC-vel) a reakció lehetséges megfordulását, így például dez-B<sup>30</sup>-inzulinná, inhibitorok, így például aprotinin, butilamin vagy tozil-L-lizilklórmetil-kezon adagolásával akadályozzuk. Ezt követően az elegyet hígíthatjuk, és a terméket preparatív oszlop-kromatográfiásan tisztíthatjuk, egyben el nem reagált kiindulási anyagtól elkülöníthetjük. Ez kristályosítással is lehetséges. A védőcsoportok lehasítása az irodalomból ismert módszerek szerint történik.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákkal közelebb-ről ismertetjük. Összehasonlító példát is adunk, amely bizonyítja, hogy a 89 007 számú európai szabadalmi leírás szerinti (I) általános képletű preproinzulin-analógok lizil-endorpeptidázal végzett hasítása során nehezen, nagy veszteséggel feldolgozható reakciótermék keletkezik.

## 1. Példa

A pGF2 (szerkesztett) protein előállítására céljából fermentált tenyészlé 30 literjét centrifugáljuk, utána sterilre szűrjük. A 7,2 pH-ra beállított oldathoz 3 liter izopropanolt adunk és az oldatot 4 liter Diaion HP-20 gyantával töltött oszlopra visszük, amelyet előzőleg 10 %-os izopropanollal mostunk. 10 5-től 50 %-ra növekvő izopropanol-gradienssel az újonnan szerkesztett pGF2 proteint az oszlopról eluáljuk. A célterméket tartalmazó frakciókat közvetlenül 300 ml 7,2 pH-jú DEAE-Sepharose gantával töltött 5 x 15 cm<sup>2</sup> méretű gyors folyású (fast flow) oszlopra visszük, foszfátpufferrel mossuk, majd pH 7,2 mellett 0 mólostól 0,5 mólusra változó konyhasó gradienssel eluáljuk. A protein azokban a frakciókban van, amelyekben az oldat vezetőképessége 20 és 30 mS közötti. Ezeket a frakciókat egyesítjük és a proteint 35 %-os telítettségig ammónium-szulfáttal kicsapjuk. 16 óra elteltével a csapadékot centrifugáljuk, vízben oldjuk, a pH-érték 4,6-ra történő beállításával újból kicsapjuk és 2 óra múlva centrifugáljuk. A termék már erősen feldúsított pGF2 protein. A végső tisztításhoz Macrobore Nucleosil 120-10 C4 (Macherey und Nagel, Düren) gyantát használunk, az oszlop méreteit úgy választjuk, hogy 100 mg pGF2 jut 100 ml oszlop térfogatra. A preparatív HPLC-oszlopot 0,1 trifluorecetsav/acetonitril rendszerrel hívjuk elő. A fúziós proteint 33 %-os acetonitrillel eluáljuk. Vákuumban szárítva szilárd anyagot kapunk.

## 2. Példa

Az 1. példa szerint előállított fúziós protein 10 mg-ját 0,4 ml 5,3 pH-já nátrium-acetát-puffer és 0,1 ml dimetil-formamid elegyében feloldjuk. 140 mg Thr(Bu<sup>t</sup>)OBu<sup>t</sup> és 50 µl lizil-endo-

peptidáz (2,6 mg/ml víz) adagolása után az elegyet szobahőmérsékleten állni hagyjuk. A 3. példában közelebbről leírt nagynyomású folyadék kromatográfiás rendszerrel követjük a reakciót. Időnként mintát veszünk, a mintát kétszeres térfogatú metanollal és tízszeres térfogatú metil-terc-butyl-éterrel feltöltjük, a kapott csapadékot tízszeres térfogatú 0,1 %-os trifluorecetsavban feloldjuk és HPLC segítségével elemezzük. 40 óra elteltével mintegy 55 % mennyiségben képződött a humán-inzulinészter, a maradék zöme dez-B<sup>30</sup>-inzulin.

### 3. Példa

Az 1. példa szerint kapott csapadékot minél kevesebb 0,1 %-os trifluorecetsavban oldjuk és HPLC segítségével preparatív szétválasztjuk. Álló fázisként 4,6 x 250 mm méretű Bakerbond Wide-Pore<sup>TM</sup> C<sub>8</sub>/5  $\mu$ m kerül felhasználásra, a mozgó fázis összetétel az alábbi:

A: 0,1 % trifluorecetsav

B: A/CH<sub>2</sub>CN = 10:90

Az áramlási sebesség 1,3 ml/perc, a gradiens időbeli összetétele az alábbi:

| t (perc) | % B |
|----------|-----|
| 0        | 25  |
| 20       | 45  |
| 25       | 45  |
| 28       | 25  |
| 35       | 25  |

15,14 perckor eluálódik a dez-B<sup>30</sup>-inzulin, 20,92 perckor az inzulinészter. A frakciókat vákuumban oldószermentesítjük,

a szilárd anyagot acetonitrillel mossuk, majd vákuumban szárítjuk.

#### 4. Példa

100 mg pGF2 proteint 10 ml 8 pH-já trisz/HCl pufferben oldunk és 50 mE (milliegyység) lizil-endorpeptidázzal inkubálunk. 2,5 óra elteltével a reakciót trifluorecetsavval végzett savanyítással (3 pH-ra) megszakítjuk, és a reakcióelegyet fordított fázison szétválasztjuk. Az oszlopból kilépő folyadékban (eluálás 30 %-os acetonitrillel) éles csúcs jelzi a B<sup>30</sup>-dez-treonin-humáninzulin megjelenését. Oldószermentesítés után 35 mg terméket kapunk, ami az elméleti hozam 95 %-a.

#### 5. Példa

Sertés hasnyálmirigyből nyert  $\alpha$ -amiláz 90 mg-ját 35 ml 0,5 mólos, 7,8 pH-já kálium-foszfát-pufferben oldjuk és az oldatot egy éjszakán át ugyanezzel a pufferrel szemben dializáljuk.

50 g Affigel 10 (BioRad 153-6046) gélt a gyártó előírása szerint mosunk és 0,5 mólos fenti kálium-foszfát-pufferrel kezelünk. A nedves gélt az enzimes oldattal szobahőmérsékleten, gyenge rázatás közben két órán át reagáltatjuk, leszivatjuk, majd rövid ideig kötési pufferrel kezeljük. Ezt követően a hordozót 30 percen át 8,0 pH-jú etanolaminnal kezelve inaktiváljuk, újból leszivatjuk, és 1 mólos konyhasóoldattal, valamint kötési pufferrel felváltva többszörösen mossuk. Mintegy 44 g nedves gélt kapunk, amelyet 4 °C hőmérsékleten, 50 mM-os kálium-foszfát-pufferrel készített 0,02 %-os azid-oldat alatt tárolunk. Kötődési mérleg ("Testomar" típusú tesztkészlettel a gyártó

Bohring cég előírása szerint meghatározva):

|                           |        |         |
|---------------------------|--------|---------|
| Kiindulási                | 1004 E | = 100 % |
| egyesített mosófolyadékok | 705 E  | = 70 %  |
| hordozó                   | 181 E  | = 18 %  |

#### 6. Példa

Az 5. példa szerint hordozón rögzített amilázt (hordozóval együtt 44 g) a 4. példa szerint hasított, nem tisztított pGF2 proteinnel proteáz-inhibitor adagolása mellett 200 ml vízben összekeverünk. 15 perc elteltével a gélét leszivatjuk és a tiszta folyadék fázist fagyasztva szárítjuk. 5 mg szintelen terméket kapunk, amely kevés vízben feloldva  $\text{Zn}^{2+}$  adagolásra kristályos dez-B<sup>30</sup>-inzulint ad.

## Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás polipeptidek vagy proteinek előállítására fúziós protein tripszin jellegű endopeptidázzal végzett enzimes hasítása útján, azzal jellemezve, hogy fúziós proteinként egy (II) általános képletű vegyületet alkalmazunk, ahol

R jelentése  $-(AS)_o$ -(peptid jellegű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor) képletű csoport, amelyben AS = Lys kivételével bármely genetikailag kódolható aminosav, o = 0 és 200 közötti, előnyösen 5 és 100 közötti, különösen előnyösen 10-től 12-ig terjedő egész szám, és (peptid jellegű  $\alpha$ -amiláz-inhibitor) = az irodalomból ismert  $\alpha$ -amiláz-inhibitorok maradéka,

P jelentése a kívánt polipeptid vagy protein,

$R^2$  jelentése  $-(AS)_p$  képletű csoport, ahol AS jelentése a fenti (kódolható aminosav Lys kivételével) és p értéke 1 és 35, előnyösen 1 - 10, különösen előnyösen 1-től 3-ig terjedő egész szám, és

m értéke 0 vagy 1 n.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan (II) általános képletű fúziós proteinekből indulunk ki, amelyben  $R^1$  csak Ala vagy Thr, előnyösen csak Thr aminosavból áll, és m, valamint n értéke 1.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan (II) általános képletű fúziós proteinekből indulunk ki, ahol R jelentése -Gly-Asn-Ser-Asn-Gly-Thr-Ala-Met-Ala-Asn-Phe-(III) képletű maradék.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal

jellemezve, hogy a reakcióelegyben a fúziós protein koncentrációját 0,02 - 15 t%-ra, előnyösen 0,5 - 5 t%-ra állítjuk be, a reakcióelegy össztömegére vonatkoztatva.

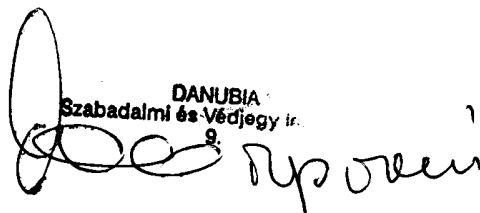
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l jellemezve, hogy tripszin jellegű endopeptidázként lizil-endopeptidázt alkalmazunk.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l jellemezve, hogy a tripszin jellegű endopeptidázt a (II) általános képletű fúziós protein össztömegére vonatkoztatva 1/50 - 1/10 000 tömegrész mennyiségben alkalmazzuk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l jellemezve, hogy az enzimes hasítást vizes oldatban, adott esetben oldódást elősegítő anyag jelenlétében, mintegy 5 és 11 közötti, előnyösen mintegy 7 és 9,5 közötti pH mellett végezzük.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l jellemezve, hogy az enzimes hasítás után a reakcióelegyet kristályosítással dolgozzuk fel.

A meghatalmazott:

  
DANUBIA  
Szabadalmi és Védjegy Ir.

1 lap



(i)



9