

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3214-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08. 04. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.04.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/419787**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/04794**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/32468**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

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

(71) Přihlášovatel:

MERCK AND CO., INC., Rahway, NJ, US;

(72) Původce:

Borneman Scott W., Rahway, NJ, US;

Goyal Anil, Rahway, NJ, US;

Conder Michael J., Rahway, NJ, US;

Vinci Victor A., Rahway, NJ, US;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob vhodný pro produkci látek, je-
jichž základ tvoří dipeptid**

(57) Anotace:

Popisuje se bioproces produkce látek, které se mohou produkovat z dipeptidového mezipro-
duktu, Způsob produkce zahrnuje produkci
rekombinantního polypeptidu, který obsahu-
je dipeptidový meziprodukt. Dipeptidový me-
ziprodukt se dále zpracovává za vzniku ko-
nečného produktu.

CZ 3214-97 A3

Způsob vhodný pro produkci látek, jejichž základ tvoří dipeptid

Oblast techniky

Způsob výroby látek, jejichž meziprodukt je dipeptid.

Dosavadní stav techniky

Popisuje se produkce látek ve velkém měřítku, které jsou alespoň zčásti založeny na meziproduktu, kterým je dipeptid. Dostupnost velkého množství dipeptidu umožňuje nízké náklady. Pro tento účel se mohou použít dipeptidy vlastně libovolných aminokyselin připravené synteticky, avšak syntéza dipeptidu může být časově náročná a nákladná, což redukuje účinnost produktu výroby a zvyšuje náklady na výrobu. Tyto nevýhody hrají zvláště důležitou úlohu při výrobě látek založených na meziproduktu, kterým je dipeptid, ve velkém měřítku.

Podstata vynálezu

Popisuje se postup výroby látek, jejichž meziprodukt je dipeptid. Uvedené látky se vyrábějí metodami genového inženýrství ze syntetické sekvence DNA nebo z přirozeně se vyskytující sekvence DNA. Oba druhy uvedených sekvencí kódují protein nebo peptid, který má specifické repetice dipeptidové sekvence. Dipeptidové meziprodukty se uvolňují z většího proteinu nebo peptidu, dále se zpracovávají za vzniku konečné látky.

Dipeptidové meziprodukty vznikají v rekombinantních hostitelských buňkách expresí rekombinantní molekuly DNA, která kóduje nejméně jeden dipeptidový meziprodukt. Rekombinantní molekula DNA může být buď syntetická molekula DNA nebo přirozeně se vyskytující sekvence DNA. DNA kódující dipeptid se klónuje do expresivního vektoru za účelem exprese v rekombinantní hostitelské buňce. Po expresi v

rekombinantním hostiteli se dipeptid izoluje za účelem dalšího zpracování. Před izolací dipeptidu může být nezbytné oddělit dipeptid od většího polypeptidu. Větší polypeptid, který obsahuje dipeptidový meziprodukt může zahrnovat více repetitivních sekvencí dipeptidu nebo se může vyskytovat v jedné nebo více kopiích, jako část většího proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci, které nejsou dipeptidovou sekvencí. Repetice dipeptidové sekvence se mohou rozdělit na jednotlivé dipeptidy enzymatickým nebo chemickým štěpením. Jednotlivé dipeptidy se pak mohou dále čistit za účelem dalšího zpracování. Rekombinantními hostitelskými buňkami, které se používají k produkci dipeptidu, mohou být libovolné hostitelské buňky, které jsou schopny exprimovat rekombinantní molekuly DNA. Odborníkovi je často jasné, že prakticky libovolný rekombinantní hostitel je vhodný při použití v procesu podle vynálezu. Preferované hostitelské buňky zahrnují, ale nejsou limitovány na bakterie a buňky hub mezi něž patří kvasinky. Bakteriální a hostitelské buňky hub, které jsou použitelné podle vynálezu a jsou běžně dostupné zahrnují, ale nejsou limitovány na *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces lividans* a *Bacillus subtilis*.

Odborníkům je také zřejmé, že expresivní vektory pro expresi DNA kódující dipeptid může být v podstatě libovolný expresivní vektor použitelný ve vybraných hostitelských buňkách. Preferované vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na ty, které jsou použitelné v bakteriích a v buňkách hub, mezi něž patří kvasinky. Bakteriální a houbové expresivní vektory, které jsou vhodné při použití podle vynálezu a jsou běžně dostupné, zahrnují, ale nejsou omezeny na ty, jež jsou zde uvedeny.

Oddělení dipeptidu od zbývajících dipeptidových sekvencí nebo oddělení jednotlivých dipeptidů od dipeptidových repetitivních

proběhlo enzymaticky za použití enzymu, který štěpí polypeptid ve vhodném místě, aniž dojde k porušení dipeptidového meziproduktu. Enzymy vhodné pro použití v uvedeném procesu podle vynálezu jsou běžně dostupné nebo se produkují v organismu, který má vhodnou enzymatickou aktivitu. Výběr vhodného enzymu závisí na skutečnosti, zda bude exprimována určitá dipeptidová sekvence.

Dipeptid se může izolovat buď před nebo po jeho separaci od zbytku polypeptidu nebo od repetitivního dipeptidu. V procesu podle vynálezu se mohou za účelem izolace použít standardní chromatografické metody, mezi něž patří, ale nejsou omezeny na frakcionaci solí, iontoměničovou chromatografii, vylučovací chromatografii na základě velikosti, adsorbční chromatografii na hydroxylapatitu a chromatografie na základě hydrofóbních interakcí.

Klónovaná DNA získaná zde popsaným způsobem může být rekombinantně exprimovaná molekulárním klónováním do expresivního vektoru, který obsahuje vhodný promotor a jiné vhodné elementy, jež regulují transkripci. Tento vektor se zavede do prokaryontních nebo eukaryontních hostitelských buněk za účelem produkovat rekombinantní peptid. Způsob takových manipulací se popisuje v publikaci Sambrook, J. et al., (citace uvedena shora) a jsou v oboru dobře známy.

Expresivní vektory se zde definují jako sekvence DNA, které jsou nutné pro transkripci klónovaných kopií genů a pro translaci jejich mRNA ve vhodném hostiteli. Takové vektory se mohou použít pro expresi eukaryontních genů v různých hostitelích, jako jsou bakterie, sinice, rostlinné buňky, hmyzí buňky, buňky hub a zvířecí buňky.

Specificky vytvořené vektory umožňují přenos DNA mezi hostiteli jako jsou bakterie-kvasinky nebo bakterie-zvířecí buňka nebo bakterie-buňka hub nebo bakterie-buňka obratlovců. Vhodně konstruovaný expresivní vektor by měl obsahovat:

počátek replikace pro autonomní replikaci v hostitelských buňkách, selekční markery, omezený počet použitelných restričních míst, potenciál pro tvorbu vysokého počtu kopií a aktivní promotory. Promotor se definuje jako sekvence DNA, která řídí navázání RNA polymerázy na DNA a inicijuje syntézu RNA. Silný promotor je ten, který inicijuje mRNA ve vysoké frekvenci. Expresivní vektory mohou zahrnovat, ale nejsou omezeny na klónovací vektory, modifikované klónovací vektory, specificky vytvořené plazmidy nebo viry.

Různé savčí expresivní vektory se mohou použít k expresi rekombinantního peptidu v savčích buňkách. Obecně dostupné savčí expresivní vektory, které jsou vhodné pro expresi rekombinantního peptidu zahrnují, ale nejsou omezeny na pcDNA3 (Invitrogen), pMclneo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593 pBPV-1(8-2) (ATCC37110), pDBPV-MMTneo(342-12)(ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo(ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) a λ ZD35(ATCC 37565).

Různé bakteriální expresivní vektory se mohou použít pro expresi rekombinantního peptidu v bakteriálních buňkách. Běžně dostupné bakteriální expresivní vektory, které jsou vhodné pro expresi rekombinantního peptidu zahrnují, ale nejsou omezeny na pET11a (novagen), lambda gtl1 (Invitrogen), pcDNAII (Invitrogen), pcDNAII (Invitrogen), pKK223-3 (Pharmacia).

Různé expresivní vektory buněk hub se mohou použít pro expresi rekombinantního peptidu v buňkách hub. Běžně dostupné expresivní vektory buněk hub, které jsou vhodné pro expresi rekombinantního peptidu zahrnují, ale nejsou omezeny na pYES2 (Invitrogen), expresivní vektor *Pichia* (Invitrogen).

Různé expresivní vektory hmyzích buněk se mohou použít pro expresi rekombinantního peptidu v hmyzích buňkách. Běžně dostupné expresivní vektory hmyzích buněk, které jsou vhodné

pro rekombinatní expresi peptidu zahrnují, ale nejsou omezeny na pBlue Bac III (Invitrogen).

Expresivní vektor obsahující DNA kódující dipeptidový meziprodukt se může použít pro expresi peptidu v rekombinantní hostitelské buňce. Rekombinantní hostitelské buňky mohou být prokaryontní nebo eukaryontní, mezi něž patří, ale nejsou omezeny na bakterie, jako jsou *E.coli*, buňky hub, jako jsou kvasinky, buňky savců, mezi ně patří, ale nejsou omezeny na linie buněk lidského, hovězího, vepřového, opičího původu a buňky hlodavců a hmyzí buňky, mezi ně patří, ale nejsou omezeny na *Drosophila* a buňky získané z housenky bource morušového. Buněčné linie získané z savčích druhů, které jsou vhodné a které jsou obecně dostupné zahrnují, ale nejsou omezeny na L buňky L-M(TK-) (ATCC CCL 1.3), L buňky L-M (ATCC CCL 1.2), 293 (ATCC CRL 1573), Raji (ATCC CCL 86), CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1(ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) a MRC-5 (ATCC CCL 171).

Expresivní vektor se může zavést do hostitelských buněk libovolným způsobem vybraným ze skupiny, která zahrnuje, ale není omezena na transformaci, transfekci, lipofekci, fúzi protoplastů a elektroporaci. Buňky obsahující expresivní vektor se klonálně pomnožují a v jednotlivých buňkách se analyzuje produkce proteinu. Stanovení klónů hostitelských buněk, které exprimují peptid, se může provést několika způsoby, které zahrnují, ale nejsou omezeny na imunologickou reaktivitu s anti-peptidovými protilátkami a přítomnost B₁ aktivity spojené s hostitelskými buňkami, jako je specifické navázání ligandu na peptid nebo signální transdukce, která se definuje jako odezva zprostředkovaná interakcí B₁ specifických ligandů na receptor.

Expres DNA se může také uskutečnit použitím *in vitro* produkované syntetické mRNA nebo nativní mRNA. Syntetická mRNA nebo mRNA izolovaná z buněk, které produkují peptid se může účinně překládat do různých bezbuněčných systémů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na extrakry moučných červů a extrakty retikulocytů, stejně jako se mohou účinně překládat do buněčných systémů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na mikroinjekce do žabích oocytů.

Aby se určily sekvence DNA, které nebo která umožňuje získat optimální hladinu proteinu, mohou se konstruovat molekuly DNA, které zahrnují, ale nejsou omezeny na otevřený čtecí rámec DNA v plné délce a několik konstrukcí, které obsahují části DNA kódující protein.

Úroveň exprese proteinu se může určit následným zavedením, jak zavedením jednotlivých konstrukcí, tak i zavedením kombinace uvedených konstrukcí do vhodných hostitelských buněk. Po stanovení kazety DNA, která dosahuje optimální exprese, například tranzientními testy se tato konstrukce DNA přenese do různých expresivních vektorů za účelem exprese v hostitelských buňkách, které zahrnují, ale nejsou omezeny na buňky savců, hmyzí buňky, *E.coli* a buňky kvasinek, jako jsou *S.cerevisiae*.

Následujícími metodami se testuje hladina proteinu v hostitelských buněčných transfektantech a oocytech po mikroinjekci. Po vhodném časovém úseku, který umožňuje expresi se měří hladina proteinu. Jeden způsob pro detekci peptidu zahrnuje přímé měření hladiny peptidu v celých buňkách nebo v buněčném lyzátu, který se připravil z hostitelských buněk transfektovaných DNA.

Dipeptid alanyl-prolin, Ala-Pro je počáteční materiál pro syntézu ACE inhibitoru enalaprilu. Dipeptid Lys-Pro je počáteční materiál pro syntézu ACE inhibitoru lysinoprilu. Obecně dostupný dipeptid je současně syntetizován chemicky.

Vyvinul se nový bioproces, který úspěšně eliminuje chemické stupně při produkci Ala-Pro nebo Lys-Pro. Proces využívá rekombinantního hostitele k nadměrné expresi peptidu, který obsahuje repetice dipeptidu Ala-Pro nebo Lys-Pro. Tyto dipeptidy se pak hydrolyzují bakteriální prolypeptidázou na své Ala-Pro nebo Lys-Pro jednotky. Vzhledem k dostupnosti expresivních vektorů se vybraly jako hostitelský organizmus buňky *Escherichia coli*. Do běžně dostupného expresivního vektoru pMAL se klónoval chemicky syntetizovaný oligonukleotid, který kóduje repetice Ala-Pro, a vhodná ligační místa. Fermentací rekombinantních bakterií *E.coli*, které obsahují konstrukci, se docílí požadovaného fúzního produktu, který se určí na proteinových gelech. Pro uvolnění Ala-Pro jednotek se použilo enzymatické zpracování. Běžně dostupný faktor X se použil pro uvolnění peptidu (Ala-Pro)_{n-20}, ačkoli se mohou použít i polypeptidázy. Předchozí testování za účelem zjistit přítomnost prolylpeptidázy vedlo k identifikaci kmenů *Lactobacillus helveticus* a *Xanthomonas maltophilia*, které vykazují aktivitu proti Ala-Pro-pNA a syntetickým substrátům (Ala-Pro)_n. Ukázalo se, že surové extrakty z každé kultury se úspěšně zpracovaly (Ala-Pro)_{n-20} na Ala-Pro, což se určilo pomocí HPLC analýzy. Jestliže se zkombinovaly extrakty z obou kultur, pozoroval se synergický účinek. Myslelo se, že prolypeptidázová aktivita kmene *L. helveticus* je způsobena exopeptidázovou aktivitou, jako protiklad endopeptidázové aktivity, kterou vykazuje *X. maltophilia*. Popsaný bioproces má tu výhodu, že se nepoužívají toxické materiály běžné při chemické syntéze a může se přizpůsobit i pro jiné peptidy.

Po následující expresi dipeptidového meziprojektu v rekombinantní hostitelské buňce se může izolovat rekombinantní protein a získá se čistá forma dipeptidového meziprojektu. Může se použít několik čistících postupů. Jak

se zde popisuje, rekombinantní dipeptidové meziprodukty se mohou čistit z buněčných lyzátů a extraktů různými kombinacemi aplikace postupů frakcionace solí, iontoměničové chromatografie, vylučovací chromatografie na základě velikosti, adsorbční chromatografie na hydroxylapatitu a chromatografie na základě hydrofóbních interakcí.

Po čištění dipeptidového meziprodktu jedním nebo více zde popsanými způsoby se peptidové meziprodukty dále zpracovávají na konečný produkt. V případě dipeptidového meziprodktu Ala-Pro vzniká dalším zpracováním konečný produkt známý jako enalapril a jemu příbuzné látky. Proces uvedeného zpracování se popisuje v U.S. patentu č. 4.374.829 a U.S. patentu č. 4.555.502. V případě dipeptidového meziprodktu Lys-Pro další zpracování vede ke vzniku konečného produktu, který je znám jako lisinopril a příbuzné látky. Postup dalšího zpracování se uskutečnil podle popisu v U.S. patentu č. 4,374,829 a U.S. patentu č. 4,555,502.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Konstrukce vektoru pro expresi dipeptidu

Za účelem vytvoření vektoru, který exprimuje sekvenci DNA dipeptidových repetit se vybral plazmid. Vektor bude mít počátek replikace vhodný pro zvoleného hostitele, v jiném případě vektor může obsahovat počátky pro expresi více jak jednoho genu, což umožňuje, že bude fungovat jako pendující vektor. Geny nesoucí rezistenci na antibiotika a/nebo auxotrofní markery jsou na plazmidu nezbytné, aby potvrdily, že proběhla transformace nebo vstup vektoru do buňky a že selektivními tlaky se udržuje stabilita vektoru. Silný promotor, jako je indukovatelný promotor *tac*, umožní maximální expresi genu(ů) po směru transkripce. Zahrne se společné vazebné místo na ribozomu a toto místo je specificky

rozpoznatelné preferovaným hostitelem. Za účelem zajistit správnou délku rekombinantního peptidu se můžou do vektoru po směru transkripce umístit terminační sekvence transkripce a terminační kodony.

V jiném případě se může v expresivním vektoru kódovat fúzní protein. Vektor bude kódovat zkrácený peptid, který je obecně silně-exprimován v preferovaném hostiteli z jeho nativního promotoru nebo z jiného silného promotoru. Klónovací místa pro gen nebo oligonukleotid kódující dipeptidový meziprodukt, jako je Ala-Pro nebo Lys-Pro repetice, se může vytvořit syntetickými postupy nebo může být v místě založeném na 5'konci nebo 3'konci sekvencí DNA repetitiv. Exprimovaná výsledná konstrukce DNA dává vznik proteinu, který obsahuje zkrácený enzym nebo vazebný protein, jako je protein, který váže maltózu z bakterií *E.coli*, fúzovaný se sekvencí dipeptidového meziproduktu. Separace může jednoduše proběhnout, přičemž se fúzní partner stává použitelným. Následné zpracování odstraní peptid 5'konce. U některých hostitelů se mohou použít k vylučování požadovaného produktu signální nebo vedoucí peptidy, které umožní správný extracelulární transport.

V hostitelském organismu se může preferovaný kodon manipulovat za účelem dosažení vyšší exprese. Použitý kodon bude obecně umístěn v hostitelské buňce tak, že jeden nebo více kodonů se použije převážně během exprese specifických genů. Silně exprimované geny dávající vyšší hladiny proteinů nebo peptidů se kódují kodony, které se používají ve srovnání s ostatními častěji. U bakterií *E.coli* jsou pro lysin dostupné dva kodony AAA a AAG; pro prolin jsou možné čtyři kodony CCA, CCC, CCG a CCU. Sekvence kodonu CCG se používá častěji a tak zbytek Pro v syntetickém oligonukleotidu Lys-Pro se vytvořil jako CCG. Lys je kódován pouze dvěma kodony, které nemají jasnou preferenci. Proto oligonukleotid, který

se stane exprimovanou repeticí Lys-Pro jako Lys-Pro polypeptid, vznikl na základě obou kodonů AAA a AAG. Pro Ala-Pro oligonukleotid se preferují sekvence kodonu GCT a GCA a ty také poskytují maximální expresi v *E.coli*.

Příklad 2: Klónování DNA do expresivních vektorů *E. coli*

Produkce rekombinantního peptidu v bakteriích *E. coli* následuje po zavedení expresivní kazety peptidu do expresivních vektorů *E.coli*, které zahrnují, ale nejsou omezeny na serii pET (Novagen). Ve vektorech pET se exprese peptidu řídí přísně regulovaným bakteriofágovým vektorem T7. Pak následuje transfer této konstrukce do hostitele *E.coli*, který obsahuje chromozomální kopii genu T7 RNA polymerázy řízeného indukovatelným promotorem *lac*. Exprese peptidu je indukována, když se ke kultuře přidá vhodný substrát (IPTG). Úroveň exprimovaného peptidu se určí zde popsány testy.

cDNA kódující celý otevřený čtecí rámec peptidu je začleněn do restrikčního místa NdeI plazmidu pETIIa. Konstrukce v pozitivní orientaci se určily sekvenční analýzou a použily se pro transformaci expresivního hostitelského kmene BL21. Transformanty se pak používají pro inokulaci kultur za účelem produkce proteinu. Kultury se kultivují v mediích M9 nebo ZB, jejichž složení je odborníkům známo. Když se dosáhlo hodnoty $OD_{600}=1,5$, indukovala se exprese peptidu po dobu 3 hodin při teplotě 37°C 1mM IPTG.

Příklad 3: Klónování DNA do vektorů vhodných pro expresi ve hmyzích buňkách.

Bakulovirové vektory, které se získaly z genomu AcNPV viru, jsou vytvořeny tak, aby poskytly silnou expresi cDNA v linii Sf9 hmyzích buněk (ATCC CRL#1711). Rekombinantní bakulovirová exprimující DNA kódující dipeptidový meziprodukt se tvoří následujícími standardními metodami (InVitrogen

Maxbac Manual): konstrukce DNA se ligují do genu polyhedrinu v různých bakulovirových transferových vektorech, které zahrnují vektory pAC360 a BlueBac (InVitrogen). Rekombinantní bakuloviry vznikají homologní rekombinací, po níž následuje kotransfekce bakulovirového transferového vektoru a linearizované genomové DNA AcNPV (Kitts, P.A., Nuc. Acid. Res. 18, 5667-(1990)) do buněk Sf9. Rekombinantní viry pAC360 se určily na základě absence inkluzních tělísek v infikovaných buňkách a rekombinantní viry pBlueBac se určily na základě exprese β -galaktozidázy (Summers, M.D. and Smith, G.E., Texas Agriculture Exp. Station Bulletin No. 1555). Pak následuje izolace plaků a exprese peptidu se měří zde popsaným testem.

cDNA kódující celý otevřený čtecí rámec peptidu se vnese do BamHI restričního místa vektoru pBlueBacII. Sekvenční analýzou se určí konstrukce v pozitivní orientaci a použijí se pro transfekci buněk Sf9 za přítomnosti lineární AcNVP DNA divokého typu.

Ve spojení s infikovanými buňkami se našel autentický peptid. Peptid se extrahoval z infikovaných buněk hypotonickou lyzí nebo lyzí za pomoci detergentu.

V jiném případě se peptid exprimoval v buněčné línii Schneider 2 *Drosophila* kotransfekcí buněk Schneider 2 vektorem, který obsahuje DNA peptidu po směru transkripce, přičemž tato DNA se řídí indukovatelným metallothioninovým promotorem a vektorem, který nese gen resistance na neomycin G418. Následuje kultivace buněk za přítomnosti G418, přičemž se získaly rezistentní buňky a přidáním CuSO_4 se indukovala exprese peptidu.

Příklad 4: Klónování DNA do kvasinkového expresivního vektoru

Rekombinantní peptid se exprimuje v kvasinkách *S.cerevisiae*. Optimální DNA cistronu se vnesla do

expresivního vektoru tak, že řídí intracelulární nebo extracelulární expresi heterologních proteinů. V případě intracelulární exprese vektory, jako jsou EmBLyex4 nebo podobné, se ligují do cistronu (Rinas, U. et al., Biotechnology 8, 543-545 (1990); Horowitz B. et al., J. Biol. Chem. 265, 4189-4192 (1989)). V případě extracelulární exprese se cistron liguje do kvasinkových expresivních vektorů, které fúzíují sekreční signál. Hladiny exprimovaného peptidu se určily zde popsáním testem.

Příklad 5: Izolace rekombinantního peptidu

Rekombinantně produkováný peptid se může čistit protilátkovou afinitní chromatografií.

Afinitní peptidové protilátkové kolony vznikají přidáním anti-peptidových protilátek k přípravku Affigel-10 (Biorad). Jde o gelové podloží, které se preaktivuje estery N-hydroxysukcinimidu, přičemž protilátky tvoří kovalentní vazbu s lůžkem z agarózového gelu. Protilátky se pak spojují s gelem prostřednictvím amidových vazeb se "spacer arm". Zbývající aktivované estery jsou pak deaktivovány 1M etanolaminem HCl (pH8). Kolona se promývá vodou a pak 0,23M glycinem HCl (pH2,6), přičemž se odstraní libovolné nekonjugované protilátky nebo volný protein. Kolona se pak ekvilibruje fyziologickým roztokem pufovaným fosforečnanem (pH7,3) smíchaným s činidlem pro smáčení vhodné membrány, jako je detergent. Supernatant buněčné kultury nebo buněčné extrakty obsahující rozpuštěný peptid pomalu procházejí kolonou. Kolona se pak promývá fyziologickým roztokem pufovaným fosforečnanem, který obsahuje detergenty až do okamžiku, kdy optická hustota (A280) se sníží na hodnotu pozadí, pak se protein vymyje 0,23M glycin-HCl (pH2,6) smíchaným s detergenty. Izolovaný protein se pak dialyzuje proti fyziologickému roztoku pufovaným fosforečnanem.

Příklad 6: Rekombinantní produkce dipeptidu Ala-Pro
Exprese Ala-Pro

Strategie produkce Ala-Pro polypeptidu v bakteriích *E.coli* zahrnuje klónování sekvence kódující repetice Ala-Pro. Existuje řada komerčně dostupných systémů. Za účelem minimalizovat čas vývoje se použil obecně dostupný systém p-MAL, který se získal od firmy New England Biolabs. Systém používá vektor obsahující gen proteinu vázající maltózu, který je přilehlý k polylinkru, do kterého se klónuje sekvence DNA, jako je Ala-Pro repetice. Následuje indukce klónu, který obsahuje výše uvedený vektor a exprimuje se fúzní protein (maltóza-Ala-Pro_n). Doména vázající maltózu se používá pro navázání na kolonu s maltózou a pak následuje izolace, kdy maltózová doména se štěpí faktorem X.

Směrem k tomuto konci se navrhly dva komplementární oligonukleotidy (87-mer a 91-mer), které kódují jednotky se 14 Ala-Pro a terminační kodon. Oligonukleotidy se syntetizovaly pomocí standardních metod. Oligonukleotidy se čistily pomocí SDS-PAGE a extrahovaly se z gelu. Aby se dosáhlo správného sestavení a ligace ala-pro genu do plazmidu, provedlo se klónování za použití tupého a kohezního konce. Po transformaci do buněk *E.coli* se vybraly pozitivní klóny. Proteinová analýza a indukční experimenty na jednom klónu AP/2 ukazují, že fúzní proteiny se produkují následnou indukcí. Určení velikosti pruhu na SDS-PAGE gelech naznačuje, že vzniká více jak jeden fúzní produkt. Nicméně indukce a produkce fúzního proteinu je jasná.

Obavy o změnu uspořádání klónované sekvence a správné rozpoznání terminačního kodonu, který je umístěn v oligonukleotidu vede ke sekvenování vložené DNA. DNA klónu se sekvenovala za použití M13 univerzálního primeru. Je zajímavé, že sekvence inzertu kóduje 20 repetice Ala-Pro místo

14 repetit Ala-Pro. Terminální kodon TAG je přítomný na konci 20 repetit. Uvažuje se, že přítomnost (Ala-Pro)₂₀ je způsobena dvěma nukleotidy, které mají zesílený střídavě uspořádaný patern a výsledné mezery jsou během rekombinace vyplněny polymerázou. Není neobvyklé, že zesílení je způsobeno sekvencí s vysokým počtem repetit. V tomto případě je výhodné, když to vede k vytvoření delšího genu (který obsahuje více repetit Ala-Pro).

Hydrolýza Ala-Pro substrátu

Tři bakteriální kultury *Lactobacillus helveticus*, *L.sp.*, a *Xanthomonas maltophilia* vykazující podle literatury prolyldipeptidázovou aktivitu se získaly z ATCC. Kultury se kultivovaly v lahvích o objemu 250 ml a jejich hydrolytická aktivita se testovala proti běžně dostupnému kolorimetrickému substrátu Ala-Pro-pNA (zdroj). Všechny tři kultury vykazují aktivitu, jejíž velká část je spojená s buňkami (tabulka č. 1). Následně se připravily zásobní kultury na šikmém agaru a ve zmrazeném FVM. K optimálnímu růstu na šikmém agaru a ve stacionární kapalně kultuře laktobacili vyžadují mikroaerofilní komoru.

Tabulka č. 1: Specifická aktivita prolyldipeptidáz na (ALA-PRO)₂

Kultura ⁴	Specifická aktivita (U/mg) ¹	U/L ¹	pH opt. ²	opt. Teplota ³
<i>L.Helveticus</i>	0,156	8	5,6	50°C
<i>L.unk.sp.</i>	0,085	14,7	6,0	40°C
<i>X.maltophilia</i>	0,446	107	6,6	45°C

1. kde se uvolní U-μmol ALA-PRO za minutu při teplotě 37°C a optimálním pH

2. citrát fosforečnanový pufr při optimální teplotě
3. probíhá při pH 8,0
4. enzymové extrakty z virtisem homegenizovaných buněk

Bylo vhodné získat substráty, které mohou reflektovat na aktuální oligomerní Ala-Pro substrát, který je dostupný. Následuje kultivace rekombinantních buněk *E.coli*. S tímto ohledem se syntetizovaly ve firmě Biosynthesis Inc. peptidové oligomery použitelné jako prolylpeptidázové substráty. Za účelem zhodnotit enzymovou aktivitu proti autentickým substrátům Ala-Pro se vyvinula metoda HPLC, kterou se separují peptidy s nízkou molekulovou vahou a volné aminokyseliny. Peptidová polymeráza z Biosynthesis se následovně izolovala za použití metody HPLC. Následuje sběr frakcí z HPLC. Jsou dostupné peptidy s 2, 4 a 6 repetitami. Stanovila se optimální teplota a hodnota pH pro každý surový substrát (tabulka č. 2). Kultura *L.helveticus* poskytuje nejvyšší titr enzymu a specifické aktivity. Pro všechny studie se použily literaturou doporučená komplexní media. Neprováděla se žádná optimalizace medií nebo jejich testování. Na základě odlišností ve výskytu hydrolytických produktů se ukázalo, že *Lactobacilli* produkují endo-prolyldipeptidázu a *Xanthomonas* produkuje exopeptidázu. Výhodou tohoto pozorování je dosažení synergického účinku při hydrolýze Ala-Pro6 kombinací enzymů.

Zdroj enzymu	Protein (mg/ml)	U/L ¹ (A-P)2	Specif. aktivita (U/mg) ¹		
			(A-P)2	(A-P)4	(A-P)6
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2,04	186	1,82	2,15	0,94
<i>Lactobacillus</i> unk. Species	3,02	156	1,53	1,53	0,87
<i>Xanthomonas</i>	0,70	28	0,17	0,35	0,43

maltophilia					
-------------	--	--	--	--	--

1. jednotky definované jako ALA-Pro uvolněných za minutu při teplotě 35°C a pH7,0.
2. enzymové extrakty z homegenizovaných buněk na "bead beater".

Zjistilo se, že když se nadbytek enzymu (600x koncentrovaný v porovnání s normálními testovacími podmínkami) zavedl do Ala-Pro, Ala-Pro substrát se hydrolyzoval na alanin a prolin. Inhibitory metalo a cystein proteáz jsou účinné při inhibici hydrolyzy Ala-Pro, zatímco mají malý účinek na hydrolyzu Ala-Pro6 na Ala-Pro, což naznačuje, že oddělený enzym způsobuje štěpení Ala-Pro. Částečná izolace by také měla odstranit nežádoucí aktivity z těchto surových extraktů.

V tomto případě se dipeptidový meziprodukt Ala-Pro dále zpracovává na konečný produkt, který je známý jako enalapril a příbuzné látky. Proces zpracování se popisuje v U.S. patentu č. 4,374,829 a v U.S. patentu č. 4,555,502.

Příklad 7: Rekombinantní produkce dipeptidu Lys-Pro z rekombinantního rostlinného proteinu

Přirozeně se vyskytující sekvence bohaté na sekvence kódující Lys-Pro se nacházejí v genu proteinu buněčné stěny soji (*glycin max*) (Hong et al., J.Biol.Chem., 1990). Tři geny proteinu soji bohatého na prolin jsou SbPRP1, SbPRP2 a SbPRP3, které jsou tvořeny 256, 230 a 90 aminokyselinami. Složení aminokyselin těchto proteinů indikuje, že 34 až 40% zbytků tvoří prolin a 18 až 25% tvoří lysin. Zvláště zajímavý je SbPRP1, který obsahuje v peptidové sekvenci 37 párů aminokyselin Lys-Pro a tak se považuje za skvělý zdroj dipeptidu Lys-Pro. SbPRP3 kóduje 12 peptidových sekvencí Lys-

Pro, které zahrnují dvě Lys-Pro-Lys-Pro opakující se sekvence kódované 183 a 195 bp v genu.

Klónování genu SbPRP1 bohatého na Lys-Pro se provádí generováním primerů PCR založených na uveřejněných sekvencích DNA. Fragmenty DNA obsahující zajímavé sekvence vznikly za použití primerů a knihovny obsahující DNA soji. Výsledná DNA bohatá na kodony Lys-Pro se ligovala do vhodných restričních míst v expresivním vektoru. Za použití hostitele *E.coli* peptidy soji se exprimují a izolují z lyzovaných buněk. a použití buněk *Lactobacillus helveticus* nebo polypeptidázy získané z tohoto kmene se protein hydrolyzuje na základní aminokyseliny a malé peptidy, které zahrnují zbytky Lys-Pro. Chromatografie nebo extrakce poskytuje relativně čistý Lys-Pro.

Alternativní způsob je syntéza oligonukleotidů, které odpovídají repetitivnímu Lys-Pro-Lys-Pro v peptidu SbPRP3, umístěným na vhodných restričních místech expresivního vektoru. Exprese ve správném hostiteli dá podstatné množství Lys-Pro ve formě oligopeptidů. Za použití *Lactobacillus helveticus* nebo polypeptidázy získané z tohoto kmene se peptid bohatý na lyzin a prolin hydrolyzuje na zbytky Lys-Pro. V jiném případě peptidáza specifická pro prolin z *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto, T. et al., Agric. Biol. Chem., 42:2417, 1978) se používá pro hydrolýzu peptidu. Chromatografie nebo extrakce poskytuje relativně čistý Lys-Pro.

V tomto případě se dipeptidový meziprodukt Lys-Pro dále zpracovává na konečný produkt, kterým je lysinopril a příbuzné látky. Proces tohoto zpracování se popisuje v U.S. patentech č. 4,374,829 a č. 4,555,502.

Příklad 8: Rekombinantní produkce dipeptidu Ala-Pro z rekombinantního proteinu z obojživelníků

Kyselý polypeptid s molekulovou hmotností přibližně 75kDa, který se nachází v zásobních granulích kožních žláz *Xenopus laevis*, který je znám jako APEG protein je bohatý na dipeptidy Ala-Pro (Gmachl, M. et al., FEBS Letters, 260: 145-148). Nejméně 80% hmoty tvoří alanin, prolin, glutamová kyselina a glycin v poměru 2:2:1:1.

cDNA expresivní knihovny ve vektoru odvozeném z vektoru lambda se může testovat pomocí oligonukleotidových sond vytvořených na základě publikované sekvence za účelem izolovat zajímavý fragment. V jiném případě protilátky k APEG se mohou použít za účelem testování takové expresivní knihovny cDNA. Fragment se může izolovat z klónu a může se začlenit do expresivního vektoru. Zpracování výsledného peptidu se provede jako v příkladu 6- hydrolyza substrátu Ala-Pro).

Preferovanou metodou je syntéza oligonukleotidu, který odpovídá přirozené sekvenci APEG DNA pro Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro (CACCAGCTCCAGCACCAG). Na základě vhodných restrikčních míst v oligonukleotidu, DNA se klónuje do expresivního vektoru za účelem exprese v rekombinantní hostitelské buňce, jak se uvádí na jiném místě. Polypeptid obsahující repetice dipeptidového meziprodktu je enzymaticky hydrolyzován, jak se popisuje shora, a dipeptidový meziproduct Ala-Pro se izoluje za účelem dalšího zpracování na konečný produkt. V tomto případě se dipeptidový meziproduct Ala-Pro dále zpracovává na konečný produkt, který je znám jako enalapril a příbuzné látky. Postup zpracování se provedl podle popisu v U.S. patentech č. 4,374,829 a č. 4,555,502.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob produkce dipeptidového meziproduktu látky, jejíž základ tvoří dipeptid, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

- (a) se v rekombinantní hostitelské buňce exprimuje rekombinantní molekula DNA, která kóduje vícenásobné repetice dipeptidového meziproduktu ve formě polypeptidu;
- (b) polypeptid podle odstavce (a) se štěpí enzymem na volný dipeptidový meziprodukt;
- (c) dipeptidový meziprodukt podle odstavce (b) se izoluje a čistí; a
- (d) dipeptidový meziprodukt se modifikuje za vzniku látky, jejíž základ tvoří dipeptid.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dipeptidový meziprodukt se vybral ze skupiny, která zahrnuje Ala-Pro a Lys-Pro.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e rekombinantní molekula DNA podle kroku a.) se vybrala ze skupiny, která zahrnuje SbPRP1, SbPRP2, SbPRP3 a APEG.