

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166546 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5164/85

(51) Int.Cl.5

C 07 K 3/00

(22) Indleveringsdag: 08 nov 1985

C 07 K 1/00

(41) Alm. tilgængelig: 10 maj 1986

(44) Fremlagt: 07 jun 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 09 nov 1984 DE 3440988

(71) Ansøger: *HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT; Brueningstrasse 45; D-W-6230 Frankfurt am Main 80, DE

(72) Opfinder: Richard *Bicker; DE, Gerhard *Seipke; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til spaltning af peptider og proteiner ved methionyl-bindingen

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5164-85

Spaltning af peptider og proteiner ved methionyl-bindingen sker ved, at man anvender chlorcyanid.

Chlorcyanid har sikkerhedsmæssige og håndteringstekniske fordele i forhold til det gængs anvendte bromcyanid.

DK 166546 B

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til spaltning af peptider og proteiner ved methionylbindingen.

Inden for rammerne af den genteknologiske udvin-
ding af peptider og proteiner (f.eks. insulin, proinsulin,
5 præproinsulin og analoge deraf, interferon, væksthormon)
har det ofte vist sig at være fordelagtigt først at iso-
lere produkterne i form af højeremolekylære "fusionspro-
teiner".

De således dannede fusionsproteiner er mere sta-
10 bile end de ønskede produkter og kan isoleres i højere udbyt-
ter ved udnyttelse af induktionssystemer. Til sådanne
fusioner kommer i princippet alle proteiner, der synteti-
seres af værtsorganismene i større mængder, på tale,
fremfor alt, når deres syntese er højinducerbar; ofte
15 beskrevne er β -galactosidasen, β -lactamasen, dele af
cro-proteinet, af C_{II} -proteinet og af tryptofanstofskif-
tets enzymer (fremfor alt Trp D, Trp E). Hertil er fusio-
ner af det ønskede genprodukt med β -galactosidase i be-
siddelse af særlig popularitet, fordi de derved først
20 dannede proteiner hyppigt er tungtopløselige og følgelig
kan højkoncentreres (A.V. Fowler og I. Zabin, J. Biol.
Chem. 258 (1983) 14354-58).

Ud fra de resulterende fusionsproteiner kan man
fraspalte de ønskede produkter ved kemiske og enzymatiske
25 fremgangsmåder, idet disse spaltningsreaktioner skal være
højsspecifikke for at undgå beskadigelser af produkterne.

Kemiske fremgangsmåder til proteinspaltning er for
det meste refereret i sammenhæng med peptid-sekvensana-
lytikken af proteiner (jfr. eksempelvis Handbook of
30 Protein Sequence Analyses, 2nd Edition, L.R. Croft,
John Wiley a. Sons; B. Witkop, Advan. Prot. Chem. 16
(1961), 221 samt E. Gross, Methods in Enzymology, Vol.
XI, 238 (1967)).

Særligt hyppigt er refereret en spaltning ved
35 methionyl-bindinger med bromcyanid (B. Witkop, Adv. Prot.

Chem. 16 (1961) 221), da man hermed i almindelighed opnår høje spaltningsudbytter uden beskadigelse af andre peptidbindinger eller aminosyresidekæder.

For at opnå høje spaltningsudbytter anvender man
5 på gængs måde store bromcyanidoverskud (op til 250 gange, jfr. B. Witkop-artiklen), beregnet på den methionyl-binding, der skal spaltes, i forbindelse med lange reaktionstider op til 30 timer og stuetemperatur. Reaktionen gennemføres i stærkt surt miljø, og et foretrukket opløsningsmiddel er
10 myresyre i et koncentrationsområde fra 70 til 88 rumfangsprocent.

Bromcyanid (BrCN) er et fast stof (smp. 52°C , kp. 62°C) og en højtoksisk forbindelse. Den dødelige dosis for et normalt menneske er 92 ppm ved en virketid på 10
15 minutter (Gmelin Syst. Nr. 14 C, Fl. D 3 1976, S. 217-241; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. Auflage 1982, Bd. 2 c, S. 4861). Ved urene præparater er beskrevet en spontan eksplosion af emballeret stof (se brochuren: Sicherheit mit Merck, E. Merck, Darmstadt 5/13090/60/1282 R).

20 Håndteringen af store mængder bromcyanid ved den højttekniserede proteinspaltning er således særdeles problematisk; foruden sikkerhedsaspekterne spiller også tekniske problemstillinger (f.eks. transport af faste stoffer) en rolle.

25 Det har nu overraskende vist sig, at methionyl-bindingen lader sig spalte med chlorcyanid (ClCN).

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til spaltning af peptider og proteiner ved methionyl-bindingen, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man gennem-
30 fører spaltningen med chlorcyanid anvendt i et molært overskud fra 2 til 30 gange pr. methionyl-binding, der skal spaltes.

Proteinspaltninger med ClCN er ikke beskrevet i litteraturen.

35 For en fagmand er anvendelsen af ClCN til den ikke-enzymatiske spaltning af proteiner ikke ubetinget

0

forudseelig, fordi ClCN har en reaktivitet, der er tydeligt forskellig fra BrCN's (jfr. Houben-Weyl, Bd. II, s.545; Ullmann Bd. 9, s. 668, B.S. Thyagarajan, The Chemistry of Cyanogen Halides 2, (1968); R.T. Parfitt, J. Chem. Soc. (C), 140, (1967)). Foruden den forskellige reaktivitet og aktivitet hos BrCN og ClCN iagttager man også forskellig reaktionsadfærd i forhold til samme reaktionspartnere.

ClCN er ved stuetemperatur en gas (smp. $-6,9^{\circ}\text{C}$, kp. $13,0^{\circ}\text{C}$); det er ikke så giftigt som BrCN (jfr. Gmelin Syst. Nr. 14 C, F 1, D 3, 1976, s. 185; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. Auflage 1982, Bd. 2 c, s. 4859). Den dødelige dosis for et menneske er 159 ppm ved en virketid på 10 minutter (jfr. 92 ppm for BrCN). Da irritationstærskelværdien for ClCN med 2,5 mg pr. m^3 ligger tydeligt lavere end værdien for BrCN (6,0 mg pr. m^3), har ClCN en større "selv-varsling". Det har således for en teknisk anvendelse vigtige sikkerhedsfordele.

Desuden har anvendelsen af ClCN også vigtige fordele med hensyn til den tekniske fremgangsmåde: ClCN kan som gas doseres og transporteres simplere og mere ufarligt end det faste stof BrCN.

Efter at reaktionen er tilendebragt, kan man fjerne chlorcyanid-overskuddet fra reaktionsblandingen ved indblæsning af en egnet gas. Egnede er indifferente gasser såsom nitrogen. Til undertrykkelse af skumdannelsen kan man anvende egnede skumdæpende midler. Velegnede er eksempelvis typerne SE 3, 6 og 9 fra firmaet Wacker Chemie. I tilslutning dertil oparbejder man reaktionsblandingen på gængs måde.

Den ClCN-holdige gasstrøm kan ledes gennem en gasvasker, der er fyldt med vandig NaOH- og/eller NaOCl-opløsning. Derved nedbrydes ClCN til NaCl og NaOCN (jfr. Gmelin Syst. Nr. 14 C, F 1, D 3, 1976, s. 184; Petty's Industrial Hygiene and Toxikology, 3. Auflage 1982, Bd. 2 c, s. 4859).

Ved denne fremgangsmåde kan man bortskaffe spaltningsreagenset (ClCN) væsentligt mere sikkert end det mere giftige BrCN. Bortskaffelsen er dermed tidsligt og rumligt adskilt fra proteinisoleringen, der kan gennemføres ved kendte fremgangsmåder (inddampning, frysetørring).

Man anvender fortrinsvis chlorcyanid i et molært overskud fra 5 til 8 gange pr. methionyl-binding, der skal spaltes. Reaktionstiden er sædvanligvis fra 1 til 10 timer, fortrinsvis fra 3 til 6 timer.

Som reaktionsmedium egner sig en blanding af vand og en mineralsyre eller en med vand blandbar organisk syre. Organiske syrer, såsom myresyre, foretrækkes. Indholdet af myresyre i reaktionsmediet kan være fra 50 til 95 rumfangsprocent, fortrinsvis fra 65 til 88 rumfangsprocent.

De følgende eksempler tjener til belysning af opfindelsen.

Eksempel 1 (sammenligningseksempel).

1 g β -Galactosidase fra E. Coli (indhold ca. 70%, methionin-indhold 0,16 mmol pr. g, bestemt ved aminosyre-analyse) røres sammen med 7,5 ml 70 volumenprocents HCOOH, og der tilsættes 0,135 g (1,28 mmol) bromcyanid.

Reaktionsblandingen omrøres i 6 timer ved stuetemperatur, fortyndes med 100 ml H₂O og frysetørres.

Remanensen udgør 0,97 g spaltningsproteinblanding.

Ved gelelektroforesen (SDS-PAGE) kan man ikke længere se nogen β -galactosidase. Man finder fortrinsvis prote-infragmenter i et molekylvægtsområde fra 5.000 til 20.000 Dalton. Ifølge aminosyreanalyse og gaskromatografisk methylrhodanidbestemmelse udgør spaltningsgraden 94%.

Eksempel 2

1 g β -Galactosidase fra E. coli (indhold ca. 70%, methionin-indhold 0,16 mmol pr. g, bestemt ved aminosyreanalyse) røres sammen med 7,5 ml 70 volumen-%'s HCOOH, og der tilsættes 0,079 g (1,28 mmol) ClCN.

0

Reaktionsblandingen omrøres i 6 timer ved stuetemperatur.

Efter at reaktionen er tilendebragt, tilsætter man fra 1 til 5 μ l skumdæpende middel (SE 9 fra firmaet Wacker Chemie, Burghausen), og det overskydende chlorcyanid fjernes ved indblæsning af N_2 (15 l pr. time) i ca. 1,5 timer. Den chlorcyanid-holdige N_2 -strøm ledes til en vaskeflaske, fyldt med vandig natriumhydroxid-opløsning.

Efter uddrivelsen af chlorcyanidet fortyndes opløsningen med 100 ml H_2O og frysetørres. Remanensen udgør 1 g.

Ved SDS-PAGE kan man ikke længere se nogen β -galactosidase. Man finder fortrinsvis proteinfragmenter i et molekylvægtsområde fra 5.000 til 20.000 Dalton. Ifølge aminosyreanalyse og gaskromatografisk methylthiodanidbestemmelse udgør spaltningsgraden 93%.

Eksempel 3

1 g β -Lactamase, isoleret fra E. Coli-celler, som indeholder plasmidet pBR 322 (indhold ca. 75%, methioninindhold 0,28 mmol pr. g) røres sammen med 10 ml 70 volumen-%'s $HCOOH$, og der tilsættes 0,236 g (2,28 mmol) $CICN$.

Reaktionsblandingen omrøres i 6 timer ved stuetemperatur.

Efter at reaktionen er tilendebragt, tilsættes der fra 1 til 5 μ l skumdæpende middel (SE 9 fra firmaet Wacker Chemie, Burghausen), og det overskydende chlorcyanid fjernes ved indblæsning af N_2 (15 l pr. time) i ca. 1,5 timer. Den chlorcyanid-holdige N_2 -strøm ledes til en vaskeflaske, fyldt med vandig natriumhydroxid-opløsning.

Efter uddrivelsen af chlorcyanidet fortyndes opløsningen med 100 ml H_2O og frysetørres.

Remanensen udgør 0,99 g.

Ved SDS-PAGE kan man ikke længere se nogen β -lactamase. Man finder fremfor alt proteinfragmenter i et mole-

0

kylvægtsområde fra 3.000 til 10.000 Dalton. Ifølge amino-syreanalyse og gaskromatografisk methylrhodanidbestemmelse udgør spaltningsgraden 92%.

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til spaltning af peptider og protei-
ner ved methionyl-bindingen, k e n d e t e g n e t ved, at
man gennemfører spaltningen med chlorcyanid anvendt i et
5 molært overskud fra 2 til 30 gange pr. methionyl-binding,
der skal spaltes.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at man, efter at reaktionen er tilendebragt, fjerner
chlorcyanidoverskuddet fra reaktionsblandingen med en
10 egnet gas og derpå oparbejder reaktionsblandingen på
gængs måde.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t
ved, at man fjerner chlorcyanid-overskuddet fra reaktions-
blandingen med nitrogen.

15 4. Fremgangsmåde ifølge ét af kravene 1-3, k e n -
d e t e g n e t ved, at man anvender chlorcyanid i et
molært overskud fra 5 til 8 gange pr. methionyl-binding,
der skal spaltes.

5. Fremgangsmåde ifølge ét af kravene 1-4, k e n -
20 d e t e g n e t ved, at man gennemfører reaktionen i lø-
bet af 1 til 10 timer.

6. Fremgangsmåde ifølge ét af kravene 3-5, k e n -
d e t e g n e t ved, at man gennemfører reaktionen i løbet
af 3 til 6 timer.

25 7. Fremgangsmåde ifølge ét af kravene 3-6, k e n -
d e t e g n e t ved, at man som reaktionsmedium anvender
en blanding af vand og en med vand blandbar syre.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t
ved, at man som reaktionsmedium anvender en blanding af
30 vand og myresyre.

9 . Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g -
n e t ved, at myresyreindholdet i reaktionsmediet udgør
fra 50 til 95 rumfangsprocent.