

pnos C12N15/09
C12P21/00
C12N15/70

3251/89

31755/89

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A

51328--

ELJÁRÁS PROTEINEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

HOECHST Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, NSZK

A bejelentés napja: 1989. 06. 28.

Elsőbbsége: 1988. 06. 30. (P 38 22 045.8)

K I V O N A T

A találmány tárgya eljárás proteinek előállítására.

E szerint géntechnikai úton olyan előterméket állítanak elő, amely az N-terminális végén legalább prolinnal meghosszabbított. Az előtermékből - kívánt esetben egyéb aminosavak lehasítása után - prolin-iminopeptidáz enzimmel végzett reagáltatás útján a kívánt proteint felszabadítják.

Földvár

3251/89

31755/89

Képviselő:

51328--

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGYIRODA

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY A

NS205

C12N15/09

C12P21/00

C12N15/20

ELJÁRÁS PROTEINEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main

Feltaláló: dr. HABERMANN Paul Epstein/Taunus DE

A bejelentés napja: 1989. 06. 28.

Elsőbbsége: 1988. 06. 30. (P 38 22 045.8)

66892-1023 To

A találmány tárgya eljárás proteinek előállítására. Ha proteineket bakteriális rendszerekben exprimálnak, rendszerint olyan proteint kapnak, amely N-terminálisan metioninnal hosszabbítva van. Fiziológiailag hatásos proteinek esetén ez a járulékos metionin immunogénitást idézhet elő. Az N-terminális meghosszabbodás elkerülése végett fuzió proteinek előállítása céljából olyan géneket szerkesztenek, amelyek nemkívánatos részét kémiai úton vagy enzimesen le lehet hasítani a kívánt proteinről. A kívánt protein és a melléktermék(ek) szétválasztása azonban igen bonyolult lehet, és a hozamot is csökkenti.

Egyes esetekben sikerül ugyan, hogy baktériumokban zajló közvetlen expresszió esetén az N-terminális metioninos meghosszabbodást alkalmas fermentációs körülmények alkalmazásával többé-kevésbé háttérbe szorítsák, a dezmet forma hozama azonban sohasem kvantitatív.

Még ha a metionizált formáról teljesen lemondanak, azaz eleve kisebb hozammal beérik, akkor is rendkívül nehéz a kívánt protein és a metionin-származék szétválasztása, és tetemes további hozasmcsökkenéssel jár.

N-terminálisan prolinnal kezdődő proteinek előállítására ismert olyan eljárás, amelynek során géntechnikailag nyert, rövid N-terminális meghosszabbodást, előnyösen metionincsoportot hordozó előterméket aminopeptidáz-P enzimmel hasítanak (P 38 11 921.8 sz. NSZK-beli szabadalmi bejelentés). Az eljárás kiindulási anyaga protein-elegy is lehet, ahol a proteinek csak-

beli szabadalmi bejelentés). Az eljárás kiindulási anyaga protein-elegy is lehet, ahol a proteinek csakrészben hordanak N-terminális metionincsoportot.

Ezt a gondolatot továbbfejlesztettük és azt találtuk, hogy genetikailag kódolt aminosavakból tetszőleges proteineket állíthatunk elő, ha géntechnikai úton N-terminálisan legalább prolinnal hosszabbított proteint állítunk elő, és ebből a proteinből prolin-iminopeptidáz alkalmazásával a kívánt proteint felszabadítjuk, adott esetben egyéb aminosavak aminospeptidáz enzimmel végzett előzetes lehasítása után.

A csatolt ábrán a pB32 expressziós vektor szerkesztését tüntettük fel; ez a vektor egy bifunkcionális proteint kódol, amely interleukin-2-ből és a granulociták-makrofág-serkentő faktorból (GM-CSF) származik. Ez a protein Met-Pro-val kezdődik, és a találmány szerinti eljárás egyik előnyös kiindulási anyagát képezi.

Az alábbiakban a találmány néhány előnyös kiviteli alakját ismertetjük.

A találmány szerinti eljárás kiindulási anyagaként bármely, N-terminálisan prolinnal kezdődő, technikailag előállított proteint alkalmazhatunk, így például proteolitikus lebontással előkezelt proteineket is, amelyek a 0 219 781, 0 227 938 és 0 228 018 sz. alatt publikált európai szabadalmi bejelentések szerint állíthatók elő. Előnyösen közvetlenül exprimált proteint alkalmazunk,

különösen a P 38 11 921.8 sz. NSZK-beli szabadalmi leírás szerint előállított, illetve felhasznált proteineket.

Amennyiben az egy vagy több prolincsoport előtt még egyéb aminocsoportot, főleg metionint tartalmazó proteint alkalmazunk, az említett csoportokat aminopeptidáz-P enzimmal előzetesen eltávolítjuk. Kiindulási anyagként azonban alkalmas géntechnikai eszközökkel előállított olyan protein-elegy is, amelyben a proteinek csak egy része tartalmaz metionincsoportot a prolincsoport előtt. Elvileg bármelyik olyan protein alkalmazható, amely az N-terminális végén meghosszabbodott, ugyanis az aminopeptidáz-P enzim nem-specifikus módon minden aminosavat lehasít, amely N-terminálisan a prolincsoport előtt helyezkedik el.

helyez-

A prolin-iminopeptidázt önmagában ismert módon állíthatjuk elő (Sarid et al., J. Biol. Chem. 234, 1959, 1740. oldal; 237, 1962, 2207. oldal). Előnyös azonban, ha a szokásos elektroforetikus tisztítás helyett második kromatográfiás tisztítást alkalmazunk.

A prolin enzimes lehasítást ismert módon végezzük; az enzimet szabad vagy hordozóhoz kötött alakban alkalmazhatjuk. Az enzim immobilizálását például a 0 141 223, valamint 0 141 224 sz. európai szabadalmi leírás szerint, vagy az ott megadott irodalom szerint végezhetjük.

Amennyiben előzetesen további aminosavakat hasítunk le P-aminopeptidázzal, ezt az enzimet is vagy szabad, vagy hordozóhoz kötött állapotban használhatjuk. Különösen hordozóhoz kötött enzimek esetén a két enzimes reakciót kombinálhatjuk is; az immobilizált enzimeket úgy helyezzük el a reaktorban, hogy a reakcióoldat először a kötött P-aminopeptidázzal, utána a kötött prolin-iminopeptidázzal érintkezik.

A találmány tehát lehetővé teszi definiált N-terminálissal rendelkező polipeptidek és proteinek, főleg közvetlen exprimálással kapott termékek kinyerését kimélő enzimes körülmények között. A találmány szerinti eljárás tehát mentes azoktól a hátrányoktól és korlátoktól, amelyek a kémia hasítási eljárásokra jellemzők.

Az alábbi példákkal a találmányt közelebbről ismertetjük. A részek és százalékok (ha mást nem kötünk ki) tömegrészek és tömegszázalékok.

1.példa

A prolin-iminopeptidáz elkülönítése és tisztítása

K12-W-1361:pro-met- típusu E. coli törzsből indulunk ki, az elkülönítést és tisztítást Sarid et al. fent megadott publikációja alapján végezzük. Az enzim ott leírt elektroforetikus feldusítása helyett azonban kromatográfiás eljárást alkalmazunk DEAE-cellulóz felhasználásával (a Pharmacia cég nagynyomású folyadékkromatográfiás rendszere, mono Q HR55 jelű oszlop). Az enzim tartalmu frakció-

kat "reakciópuffer"-rel szemben (0,1 mólos 5,5-dietilbarbitursav és nátriumsója - pH 8,6 - oldatának 1 ml-jére 50 μ l 0,1 mólos MnCl_2 -oldat) dializáljuk.

A P-aminopeptidázt a P 38 11 921.8 sz. NSZK-beli szabadalmi bejelentésben leírtak szerint tisztítjuk az alábbiak szerint: E. coli sejteket 50 mM-os nátrium-foszfát-pufferben feltárunk, az elegyet centrifugáljuk, és a nyers sejtkivonatot 50 °C-on 15 percen át inkubáljuk. Utána az elegyet újból centrifugáljuk és ammónium-szulfáttal kicsapást végzünk 45 % telítettség mellett. Centrifugálás után az enzim a felülúszó részben van. A további tisztítás az ismert eljárás szerint történik.

2. példa

Expresszióhoz használható plazmid szerkesztése

A O 288 809 sz. európai szabadalmi bejelentésben (illetve a 14661-88 sz. osztrák szabadalmi bejelentésben) a pB30 jelű expressziós plazmidot ismertetik. Ez a plazmid olyan bifunkcionális proteint kódol, amelyben az interleukin-2 (IL 2) aminosavsorát 15 aminosavból álló összekötő hid, ezt pedig a GM-CSF aminosavsora követi. A szerkezeti gén IL 2 része a O 163 249 sz. európai szabadalmi bejelentésben (illetve 43 070-85 sz. osztrák szabadalmi bejelentésben) leírt mesterséges génen alapul (lásd melléklet). Ez a gén restrikciós enzimek által megtámadható szinguláris vágóhelyek egész sorát tartalmazza; a PstI, XbaI, SacI enzimek vágóhelyeit génfragmensek szubklónozására

használták. A PstI-vágóhely az 21., 22. aminosav tartományában, az XbaI-vágóhely az 58-60. aminosav tartományában van. Az (1) képletű pB30 plazmidot PstI enzimmal részlegesen, XbaI enzimmal teljesen emésztjük, és az IL-2-részfragmenst kódoló kis, (2) képletű fragmenst izoláljuk.

A 0 163 249 sz. európai szabadalmi bejelentés szerint a (3) képletű oligonukleotidot szintetizáljuk (ez az ott leírt IIa képletű DNS-szekvenciának, azaz az Ia-If építőelemnek felel meg azzal a különbséggel, hogy az ATG-startkodon után a prolint kódoló CCG triplett következik toldalékként).

A kereskedelmi forgalomban kapható pUC19 jelű vektort EcoRI és XbaI enzimmal nyitjuk, és a (4) képletű nagy fragmenst a (2) és (3) képletű IL 2-részfragmenssel ligáljuk. E célból a 79/02 sz. E. coli törzs kompetens sejtjeit a ligációs eleggyel transzformáljuk, majd literenként 20 mg ampicillint tartalmazó IPTG/Xgal-lemezekben szélesztjük. A fehér telepeket izoláljuk, és a plazmid-DNS-t restrikciós és szekvencia-elemzéssel azonosítjuk. Az IL 2 első 59 aminosavat kódoló kivánt plazmidot pB31-nek nevezzük el (5.képlet).

Az (5) képletű, pB31 jelű plazmidból a (6) képletű IL 2 fragmenst EcoRI és XbaI enzimmal kivágjuk, és a megfelelő fragmnens helyére a pB30 jelű plazmidba építjük oly módon, hogy az (1) képletű pB30 plazmidot EcoRI és XbaI enzimmal emésztjük és a kapott nagy (7) képletű fragmenst a (6)

(képletét nem tüntettük fel, tekintettel arra, hogy eltérés csak az IL 2 gén ámugy sem rajzolt 5'-szakaszában van).

A pB32 jelű plazmidot az MM294 sz. E. coli törzsbe transzformáljuk, ott sokszorozítjuk, újból kinyerjük és a W3110 sz. E. coli törzsben exprimáljuk a 288 809 sz. európai szabadalmi leírásban foglaltak szerint.

3. példa

A bifunkcionális protein elkülönítése és tisztítása

Az expresszió befejeztével a sejteket centrifugáljuk és 6,5 pH-jú pufferben feltárjuk. A feltárás elegyét centrifugáljuk; a bifunkcionális protein az üledékben van. Az üledéket vízzel mossuk, majd 1 %-os dezoxikolát-oldatban szuszpendáljuk. Centrifugálás után az üledéket újból vízzel mossuk, majd 0,4 %-os N-laurozilsarkozin-nátriumsó oldatban szuszpendáljuk és a szuszpenziót egy órán át rázzuk. 10 mmólos réz-szulfát-koncentrációt állítunk be, majd 4 °C-on az elegyet egy éjszakán keresztül tovább rázzuk. Centrifugálás után a felülúszó részhez 6-szoros térfogatú acetont adunk és a kicsapódó proteint centrifugálással elválasztjuk. Az üledéket megszárítjuk és annyi 6 mólos guanidinium-hidroklorid-oldattal hígítjuk, hogy 50-100 mg/l proteint tartalmazó oldat keletkezzék, amelyet glicinpufferrel szemben (0,01 M glicin, 10 mM Iris-HCl, pH 7,5) dializálunk. Dialízis után újból centrifugáljuk az elegyet, és a felülúszó részt affinitás-kromatográfiás oszlopon engedjük keresztül, amely Affi-Gél 10 tölteten kötve IL 2 antitesteket tartalmaz. Az oszlopot először

1 mólos NaCl, 5 mM Tris-HCl oldattal, majd 10 M Tris-HCl oldattal pH-7,5) mossuk, utána a bifunkcionális proteint 0,2 n ecetsavval eluáljuk és Mn^{2+} -pufferrel szemben (Yaron et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 32 /1968/ 658).

4. példa

Az N-terminális Met-Pro-szekvencia lehasítása

A 3. példa szerint kapott bifunkcionális protein koncentrációját $5 \cdot 10^{-6}$ és 10^{-5} közötti értékre állítjuk, majd az oldathoz 0,1-1 ug/ml P-aminopeptidázt adunk és a reakcióelegyet 37-40 °C-on egy órán át reagálni hagyjuk. A reakciót 10 mM Tris-HCl oldattal (pH 7,5) szembeni dialízissel félbeszakítjuk. A reakcióelegyet a 3. példa szerinti affinitáskromatográfia segítségével szétbontjuk. A bifunkcionális proteint tartalmazó frakciókat egyesítjük és az 1. példában leírt prolin-iminopeptidáz-reakciópufferrel szemben dializáljuk. Utána annyi prolin-iminopeptidáz enzimet adunk az elegyhez, hogy az enzim : szubsztrátum tömegaránya mintegy 1 : 5 legyen. Az elegyet 40 °C-on 8-16 órán át inkubáljuk. A prolin Troll módszerével (Troll et al., J. Biol. Chem. 215 /1955/ 655) követjük. A reakciót 10^{-3} mólos cink-klorid-oldat adagolásával megszakítjuk. A reakcióterméket fordított fázisú nagynyomású folyadék kromatográfiával tisztítjuk, majd sómentesítés után az aktivitást megmérjük és a proteinszekvenciát elemezzük. Az utóbbi gyakorlatilag homogén N-terminálist mutat.

- 10 -

A biológiai aktivitás (a csontvelő proliferációs
teszttel mérve) a 288 809 sz. európai szabadalmi leírásban
ismertetett proteinével azonos.

A O 153 249 sz. alatt publikált európai szabadalmi bejelentés szerinti DNS-szekvencia

Triplett száma					0		1		2	
amino sav					Met		Ala		Pro	
nukleotid száma					1		10			
kódoló szál					5' AA		TTC		ATG GCG CCG	
nem kódoló szál					3'		G TAC		CGC GGC	

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu
	20				30			40	
ACC	TCT	TCT	TCT	ACC	AAA	AAG	ACT	CAA	CTG
TGG	AGA	AGA	AGA	TGG	TTT	TTC	TGA	GTT	GAC

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln
	50				60			70	
CAA	CTG	GAA	CAC	CTG	CTG	CTG	GAC	CTG	CAG
GTT	GAC	CTT	GTG	GAC	GAC	GAC	CTG	GAC	GTC

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
	80				90			100	
ATG	ATC	CTG	AAC	GGT	ATC	AAC	AAC	TAC	AAA
TAC	TAG	GAC	TTG	CCA	TAG	TTG	TTG	ATG	TTT

33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe
	110				120			130	
AAC	CCG	AAA	CTG	ACG	CGT	ATG	CTG	ACC	TTC
TTG	GGC	TTT	GAC	TGC	GCA	TAC	GAC	TGG	AAG

- 12 -

43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu
	140				150			160	
AAA	TTC	TAC	ATG	CCG	AAA	AAA	GCT	ACC	GAA
TTT	AAG	ATG	TAC	GGC	TTT	TTT	CGA	TGG	CTT

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu
	170				180			190	
CTG	AAA	CAC	CTC	CAG	TGT	CTA	GAA	GAA	GAG
GAC	TTT	GTG	GAG	GTC	ACA	GAT	CTT	CTT	CTC

63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu
	200				210			220	
CTG	AAA	CCG	CTG	GAG	GAA	GTT	CTG	AAC	CTG
GAC	TTT	GGC	GAC	CTC	CTT	CAA	GAC	TTG	GAC

73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro
	230				240			250	
GCT	CAG	TCT	AAA	AAT	TTC	CAC	CTG	CGT	CCG
CGA	GTC	AGA	TTT	TTA	AAG	GTG	GAC	GCA	GGC

83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile
	260				270			280	
CGT	GAC	CTG	ATC	TCT	AAC	ATC	AAC	GTT	ATC
GCA	CTG	GAC	TAG	AGA	TTG	TAG	TTG	CAA	TAG

93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr
	290				300			310	
GTT	CTG	GAG	CTC	AAA	GGT	TCT	GAA	ACC	ACG
CAA	GAC	CTC	GAG	TTT	CCA	AGA	CTT	TGG	TGC

103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
	320				330			340	
TTC	ATG	TGC	GAA	TAC	GCG	GAC	GAA	ACT	GCG
AAG	TAC	ACG	CTT	ATG	CGC	CTG	CTT	TGA	CGC

113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile
	350				360			370	
ACG	ATC	GTT	GAA	TTT	CTG	AAC	CGT	TGG	ATC
TGC	TAG	CAA	CTT	AAA	GAC	TTG	GCA	ACC	TAG

123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu
	380				390			400	
ACC	TTC	TGC	CAG	TCG	ATC	ATC	TCT	ACC	CTG
TGG	AAG	ACG	GTC	AGC	TAG	TAG	AGA	TGG	GAC

133	134	135							
Thr									
	410								
ACC	TGA	TAG			3'				
TGG	ACT	ATC	AGC	T	5'				

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás protein előállítására, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy géntechnikai úton N-terminálisan legalább prolinnal meghosszabbodott előterméket állítunk elő és ebből - kívánt esetben egyéb aminosavak lehasítása után - prolin- -iminopeptidázzal végzett reagáltatás útján a kívánt proteint felszabadítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy a kívánt protein előtt N-terminálisan a Met-Pro szekvenciát tartalmazó előterméket készítünk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a géntechnikailag előállítandó előterméket közvetlen expresszióval állítjuk elő.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy az előterméket baktériumokban végzett közvetlen expresszió útján nyerjük.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy előtermékként olyan elegyet alkalmazunk, amelyben a proteineknek csak egy része tartalmaz a prolincsoport előtt metionincsoportot

A meghatalmazott:
„DANUBIA” SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA
6.

14 oldal + 1 dőrmoldal

Földián

Reponen

51328--

