



**SUOMI-FINLAND**  
**(FI)**

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLAGGNINGSSKRIFT**

**85494**

C (10) Patentansökan

Patentansökan nr 87/01/1988

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 07K 1/00, 3/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	<b>854383</b>
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	<b>07.11.85</b>
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	<b>07.11.85</b>
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	<b>10.05.86</b>
(44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	<b>15.01.92</b>
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
09.11.84 DE 3440988 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Bicker, Richard, Brunnenstrasse 40, Liederbach, BRD, (DE)  
2. Seipke, Gerhard, Brunnenweg 4, Wiesbaden, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä peptidien ja proteiinien pilkkomiseksi metionyyლისidoksesta**  
**Förfarande för avspaltning av peptider och proteiner av metionylbindning**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

-----

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää peptidien ja proteiinien pilkkomiseksi metionyyლისidoksesta jolloin pilkkominen suoritetaan kloorisyaanilla.

Uppfinningen avser ett förfarande för spjälkning av peptider och proteiner vid metionyl-bindningen, varvid spjälkningen sker med tillhjälp av klorcyan.

Menetelmä peptidien ja proteiinien pilkkomiseksi metionyyლისidoksesta

5 Valmistettaessa geeniteknologisesti peptidejä ja proteiineja (esim. insuliinia, proinsuliinia, preproinsuliinia ja sen analogeja, interferonia, kasvuhormonia) on usein osoittautunut edulliseksi eristää tuotteet ensiksi suurempimolekyylisinä "fuusioproteiineina".

10 Näin muodostuvat fuusioproteiinit ovat stabiilimpia kuin halutut tuotteet ja ne voidaan eristää suurempina saantoina induktiosysteemejä hyväksikäyttäen. Tällaisissa fuusioissa kyseeseen tulevat periaatteessa kaikki isäntä-organismien suuremmissa määrissä syntetisoimat proteiinit, ennen kaikkea, jos niiden synteesi on hyvin indusoitavissa; hyvin usein on kuvattu  $\beta$ -galaktosidaasia,  $\beta$ -laktamaasia ja Cro-proteiinin,  $C_{II}$ -proteiinin ja tryptofaani-ai-  
15 neenvaihduksen entsyymien osia (ennen kaikkea Trp D, Trp E). Tällöin suuressa suosiossa ovat halutun geenituotteen fuusiot  $\beta$ -galaktosidaasin kanssa, koska tällöin ensiksi  
20 muodostuvat proteiinit ovat usein niukkaliukoisia ja täten hyvin puhdistettavissa. (A.V. Fowler ja I. Zabin, J. Biol. Chem. 258 (1983) 14354-58).

25 Halutut tuotteet voidaan pilkkoa tulokseksi saatavista fuusioproteiineista kemiallisin ja entsyymaattisin menetelmin, jolloin näiden pilkkomisreaktioiden tulee olla hyvin spesifisiä, jotta vältettäisiin tuotteiden vaurioituminen.

30 Proteiinien pilkkomisessa käytettyjä kemiallisia menetelmiä on useimmiten kuvattu proteiinien peptidi -sekvenssianalyysien yhteydessä (katso esim. Handbook of Protein Sequence Analyses, 2. painos, L.R. Croft, John Wiley & Sons B. Witkop, Advan. Prot. Chem. 16 (1961) 221) sekä E. Gross, Methods in Enzymology, Vol. XI, 238 (1967).

35 Erityisen usein on kuvattu metionyyლისidoksista bromisyaanilla tapahtuvaa pilkkoutumista (B. Witkop, Adv.

Prot. Chem. 16 (1961) 221, koska tällöin yleensä saavutetaan korkeita pilkkoutumis-saantoja muita peptidisidoksia tai aminohapposivuketjuja vaurioittamatta.

5 Korkeiden pilkkoutumissaantojen saavuttamiseksi käytetään tavallisesti suuria bromisyaaniylimääriä (aina 250-kertaista ylimäärää, kts. em. B. Witkop'in artikkeli) pilkottavien metionyyლისidosten määrään nähden, reaktio-  
aikojen ollessa pitkiä, aina 30 tuntiin saakka huoneen  
10 lämpötilassa. Reaktio suoritetaan voimakkaasti happamassa ympäristössä ja edullisena pidetty liuotin on muurahais-  
happo, sen pitoisuuden ollessa 70 - 88 tilavuusprosenttia.

Bromisyaani (BrCN) on kiinteä aine (sp. 52 °C, kp. 62 °C) ja hyvin myrkyllinen yhdiste. Kuolettava annos  
15 tavallisella ihmisellä on 92 ppm vaikutusajan ollessa 10 minuuttia (Gmelin Syst. no. 14 C, Fl. D 3 1976, s. 217 -  
241; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. painos 1982, osa 2 c, s. 4861). Epäpuhtaiden valmisteiden kohdal-  
la on kuvattu pakkausten spontaania räjähdystä (katso esi-  
te Sicherheit mit Merck, E. Merck, Darmstadt 5/13090/60/  
20 1282 R).

Suurempien määrien bromisyaania käsittely on protei-  
teiinien suurimittakaavaisessa pilkkomisessa tämän johdos-  
ta hyvin ongelmallista, sillä turvallisuusnäkökohtien  
ohella on myös merkitystä teknisillä kysymyksillä (esim.  
25 kiinteiden aineiden kuljetus).

Nyt todettiin yllättävää kyllä, että metionyyლისidos voidaan pilkkoa kloorisyaanilla (ClCN).

Keksintö koskee tämän johdosta menetelmää peptidien  
ja proteiinien pilkkomiseksi metionyyლისidoksesta, jolle  
30 menetelmälle on tunnusomaista, että pilkkominen suoritetaan kloorisyaanilla reaktioväliaineessa, joka on veden ja  
muurahaishapon seos, 3 - 6 tunnissa, jolloin kloorisyaania  
käytetään 5 - 8-kertainen molaarinen ylimäärä pilkottaviin  
metionyyლისidoksiin nähden.

35 Kirjallisuudessa ei ole kuvattu kloorisyaanilla ta-

pahtuvaa proteiinien pilkkomista.

Asiantuntijalle kloorisyaanin käyttö ei-entsyymaattisessa proteiinien pilkkomisessa ei välttämättä ole ennakoitavissa, koska kloorisyaanilla on selvästi erilainen  
5 kemiallinen reaktiivisuus kuin bromisyaanilla (vertaa tällöin Houben-Weyl, osa II, s. 545; Ullmann osa 9, s. 668, B.S. Thyagarajan, The Chemistry of Cyanogen Halides 2 (1968); R.T. Parfitt, J. Chem. Soc. (C), 140, (1967)). Bromisyaanin ja kloorisyaanin erilaisen reaktiivisuuden ja  
10 aktiivisuuden ohella havaitaan myös erilainen reaktio samoja reaktiopartnereita kohtaan.

Kloorisyaani on huoneen lämpötilassa kaasua (sp.: -6,9 °C, kp. 13,0 °C); se ei ole niin myrkyllistä kuin bromisyaani (vertaa Gmelin Syst. no. 14 C, F 1, D 3, 1976,  
15 s. 185; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. painos 1982, osa 2 c, s. 4859). Kuolettava annos ihmisellä on 159 ppm, vaikutusajan ollessa 10 minuuttia (vrt. bromisyaanin kuolettava annos: 92 ppm). Koska kloorisyaanin ärsytys-kynnysarvo, 2,5 mg/m<sup>3</sup> on selvästi alhaisempi  
20 kuin bromisyaanin vastaava arvo (6,0 mg/m<sup>3</sup>), niin kloorisyaani "varoittaa itse" paremmin. Sillä on tämän johdosta teknisessä käytössä huomattavia etuja, mitä turvallisuuteen tulee.

Tämän ohella kloorisyaanin käyttö tarjoaa myös huomattavia menetelmätekniisiä etuja; kloorisyaani on kaasuna yksinkertaisemmin ja vaarattomammin annosteltavissa ja  
25 kuljetettavissa kuin kiinteä bromisyaani.

Reaktion päätyttyä kloorisyaani-ylimäärä voidaan poistaa reaktioseoksesta puhaltamalla sopivaa kaasua. Tarkoitukseen soveltuvat inertit kaasut, kuten esim. typpi. Vaahdon muodostumisen estämiseksi voidaan lisätä sopivia vaahdonestoaineita. Tarkoitukseen soveltuvat hyvin esim. tyypit: SE 3, 6 ja 9, jotka ovat firmasta Wacker Chemie. Lopuksi reaktioseosta käsitellään edelleen tavanomaisella  
35 tavalla.

Kloorisyaani-pitoinen kaasuvirta voidaan johtaa pesurin läpi, joka on täytetty vesipitoisella NaOH- ja/tai NaOCl-liuoksella. Tällöin ClCN hajoaa NaCl:ksi ja NaOCN:ksi (katso Gmelin. Syst. no. 14 C, F 1, D 3, 1976, s. 184; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. painos 1982, osa 2 c, S. 4859).

Tätä menetelmätapaa käyttämällä voidaan pilkkova reagenssi (ClCN) poistaa oleellisesti varmemmin kuin myrkyllisempi BrCN. Poistaminen voi tapahtua tällöin ajallisesti ja tilallisesti erillään proteiinin eristämisestä, mikä voidaan suorittaa tunnettujen menetelmien mukaisesti (haihduttamalla, jäähdytyskuivaamalla).

Kloorisyaania voidaan käyttää 2 - 30-kertainen molaarinen ylimäärä pilkottaviin metionyyliidoksiin nähdessä. Edullisena pidetään 5 - 8 -kertaista molaarista ylimäärää. Reaktion kesto on tavallisesti 1 - 10 tuntia, edullisesti 3-6 tuntia.

Reaktioväliaineeksi soveltuu seos, joka koostuu vedestä ja veteen sekoittuvasta orgaanisesta haposta. Edullisena pidetään muurahaishappoa. Muurahaishappopitoisuus voi reaktioväliaineessa olla 50 - 95 tilavuusprosenttia; edullisesti 65-88 tilavuusprosenttia.

Seuraavat esimerkit selventävät keksintöä.

Esimerkki 1 (vertailuesimerkki)

1 g E. Coli'sta peräisin olevaa  $\beta$ -galaktosidaasia (pitoisuus noin 70 %, metioniinipitoisuus 0,16 mmol/g, määritetty aminohappoanalyysillä) sekoitetaan 7,5 ml:aan 70 tilavuusprosenttista HCOOH:ta ja lisätään 0,135 g bro-misyaania (= 1,28 mmol).

Reaktioseosta sekoitetaan 6 tuntia huoneen lämpötilassa, laimennetaan 100 ml:lla H<sub>2</sub>O:ta ja suoritetaan jäähdytyskuivaus.

Jäännös sisältää 0,97 g pilkkoutunutta proteiini-seosta.

Geelielektroforeesissa (SDS-PAGE) ei voida havaita

enää  $\beta$ -galaktosidaasia. Proteiinifragmentit löydetään edullisesti molekyylipainoalueelta 5000 - 20 000 Daltonia. Aminohappoanalyysin ja kaasukromatografisen metyylirodanidimäärityksen mukaan pilkkoutumisaste on 94 %.

5           Esimerkki 2

1 g E.Coli'sta peräisin olevaa  $\beta$ -galaktosidaasia (pitoisuus noin 70 %, metioniinipitoisuus 0,16 mmol/g, määritetty aminohappoanalyysillä) sekoitetaan 7,5 ml:aan 70 tilavuusprosenttista HCOOH:ta ja lisätään 0,079 g ClCN:ää (1,28 mmol).

Reaktioseosta sekoitetaan 6 tuntia huoneen lämpötilassa.

Reaktion päätyttyä lisätään 1 - 5  $\mu$ l vaahdonestoainetta (SE 9, firma Wacker Chemie, Burghausen) ja ylimäärä kloorisyaania poistetaan puhaltamalla  $N_2$ :ta (15 l/h) noin 1,5 tuntia. Kloorisyaani-pitoinen  $N_2$ -virta johdetaan natronlipeällä täytettyyn pesupulloon.

ClCN:n poistamisen jälkeen liuos laimennetaan 100 ml:lla  $H_2O$ :ta ja suoritetaan jäähdytyskuivaus.

20           Jäännös on 1 g.

Geelielektroforeesissa ei ole enää havaittavissa  $\beta$ -galaktosidaasia. Proteiinifragmentit löydetään edullisesti molekyylipainoalueelta 5000 - 20 000 Daltonia. Aminohappoanalyysin ja kaasukromatografisen metyylirodanidimäärityksen perusteella pilkkoutumisaste on 93 %.

25           Esimerkki 3

1 g  $\beta$ -laktamaasia, eristetty E. Coli-soluista, jotka sisältävät plasmidia pBR 322 (pitoisuus noin 75 %, metioniinipitoisuus 0,28 mmol/g) sekoitetaan 10 ml:aan 70 tilavuusprosenttista HCOOH:ta ja lisätään 0,236 g ClCN:ää (= 2,28 mmol).

Reaktioseosta sekoitetaan 6 tuntia huoneen lämpötilassa.

35           Reaktion päätyttyä lisätään 1 - 5  $\mu$ l vaahdonestoainetta (SE 9, firma Wacker Chemie, Burghausen) ja ylimäärä

kloorisyaania poistetaan puhaltamalla  $N_2$ :ta (15 l/h) noin 1,5 tuntia. Kloorisyaani-pitoinen  $N_2$ -virta johdetaan natronlipeällä täytettyyn pesupulloon.

5 ClCN:n poistamisen jälkeen liuos laimennetaan 100 ml:lla  $H_2O$ :ta ja suoritetaan jäähdytyskuivaus.

Jäännös on 0,99 g.

10 Geelielektroforeesissa ei ole enää havaittavissa  $\beta$ -laktamaasia. Proteiinifragmentit löydetään ennen kaikkea molekyylipainoalueelta 3000 - 10 000 Daltonia. Aminohappo-analyysin ja kaasukromatografisen metyylirodanidi-määrityksen perusteella pilkkoutumisaste on 92 %.

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä peptidien ja proteiinien pilkkomiseksi metionyyლისidoksesta, t u n n e t t u siitä, että pilkko-  
5 minen suoritetaan kloorisyaanilla reaktioväliaineessa, joka on veden ja muurahaishapon seos, 3 - 6 tunnissa, jolloin kloorisyaania käytetään 5 - 8-kertainen molaarinen ylimäärä pilkottaviin metionyyლისidoksiin nähden.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktioväliaineen muurahaishappopitoisuus on 50 - 95 tilavuusprosenttia.  
10

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktion päätyttyä kloorisyaa-  
niylimäärä poistetaan reaktioseoksesta tyrellä.  
15

## Patentkrav

1. Förfarande för spjälkning av peptider och proteiner vid metionylbindningen, k ä n n e t e c k n a t  
5 därav, att spjälkningen utförs med klorcyan i ett reaktionsmedium som är en blandning av vatten och myrsyra i 3 - 6 timmar, varvid man använder ett 5 - 8-faldigt molarkriskt överskott klorcyan i förhållande till metionylbindningar som skall spjälkas.

10 2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att myrsyrainnehåll i reaktionsmediet är 50 - 95 volymprocent.

15 3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att sedan reaktionen har gått till slut, avlägnas klorsyanöverskottet med kväve.