(19) Országkód:
HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:
209 596 B

(21) A bejelentés száma: 5649/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 11. 02.
(30) Elsőbbségi adatok:
P 39 27 449 1989. 08. 19. DE
P 38 37 273 1988. 11. 03. DE

(51) Int. Cl.[5]
C 12 N 15/62
C 12 N 15/17
C 12 N 15/76

(40) A közzététel napja: 1990. 11. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1994. 08. 29. SZKV 94/08

(72) Feltalálók:
dr. Koller, Klaus Peter, Bad Soden/Taunus (DE)
dr. Uhlmann, Eugen, Glashütten/Taunus (DE)
dr. Rieb, Günther Johannes, Frankfurt/Main (DE)
dr. Wallmeier, Holger, Bad Soden/Taunus (DE)

(73) Szabadalmas:
Hoechst Ag., Frankfurt/Main (DE)

(74) Képviselő:
Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Eljárás inzulin-előtermék előállítására Streptomycetesben

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás inzulin előtermék előállítására fúziós fehérje formájában Streptomycetes gazdasejtben, oly módon, hogy egy, adott esetben módosított tendamistat génhez az inzulin B láncát az A lánccal egy Lys-t vagy Lys–Lys-t kódoló hídtaggal összekötő proinzulin struktúrgént kapcsolnak, kívánt esetben egy összekötő oligonukleotid hídtaggal, a kapott génszerkezetet expressziós plazmidba építik, az expressziós plazmiddal egy Streptomyces lividans gazdasejtet transzformálnak, a gazdasejtet tenyésztik, és a szekretálódó fúziós fehérjét a tenyészközegből kinyerik.

HU 209 596 B

A találmány tárgya eljárás Streptomycetesben inzulin előtermékek előállítására.

Ismertek olyan eljárások, amelyekben fúziós fehérjéket állítanak elő oly módon, hogy a kívánt fehérjéhez szükséges strukturgént az adott esetben módosított tendamistat-génhez kapcsolják, a struktúrgént egy streptomycetes gazdasejtben kifejezik, majd a kiváló fúziós fehérjét a tenyészetből kinyerik, lásd pl. 3 714 866 A1 számú német szövetségi köztársaságbeli és 289 936 A2 számú európai közrebocsátási iratok. Ezen leírásokban génstruktúrákat is ismertetnek, amelyek a már említett, adott esetben módosított tendamistat gént tartalmazzák, amelyek C-terminális végéhez egy másik proteinhez szükséges struktúrgén van kapcsolva, ismertek továbbá vektorok, amelyek ilyen génstruktúrákat tartalmaznak, továbbá Streptomycetes sejtek, amelyek ilyen vektorokat tartalmaznak, továbbá fúziós fehérjék, amelyeket egy adott esetben módosított tendamistat N-állású részével lehet jellemezni. A korábbi bejelentések továbbá fúziós fehérjéket írnak le, amelyekben a tendamistat aminosav-szekvenciája egy hídtagon keresztül kapcsolódik a majom-proinzulinhoz.

A fentieket továbbfejlesztve azt tapasztaltuk, hogy az ilyen eljárásokkal különlegesen előnyösen állíthatunk elő egy olyan fúziós fehérjét, amelyben a tendamistat részt egy rövidített proinzulin követ, amelynek C-lánca csupán egy vagy két lizincsoportból áll. Az ilyen előterméket különösen előnyösen és alacsony költséggel lehet humán inzulinná alakítani.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósítási formája olyan, a gén beépítésére és kifejezésére alkalmas génstruktúrákra vonatkozik, amelyek a fúziós fehérjéket kódolják.

A találmány szerinti eljárásnál felhasznált génstruktúrák alapja egy szintetikus gén, amely a proinzulinszármazékot kódolja. Célszerűen az ilyen génszerkezetek kialakításánál a Streptomycetes speciális kodonhasználatát figyelembe vesszük, ilyenkor a fúziós fehérjék kitermelése figyelemreméltóan növekszik.

Előnyös továbbá terminátor szekvenciák beépítése az ilyen génszerkezetekben, mivel ezáltal a termelékenység fokozható.

A találmány szerinti eljárás előnye, hogy a fúziós fehérjék a 161 629 számú európai szabadalmi leírás 3. példájában, valamint a 3 536 182. számú német szövetségi köztársaságbeli közrebocsátási iratban ismertetett lemez-teszttel kimutathatók. Ezáltal nemcsak az érdekes fontos klónok szelektálhatók, hanem a feldolgozás is jelentős mértékben könnyebbé válik, mivel a különböző paramétereknek a kitermelésre kifejtett hatása igen könnyen megállapítható.

A találmány szerinti eljárással előállított fúziós fehérjék nyilvánvalóan az érett inzulinnal azonos vagy legalábbis igen hasonló szerkezetűek. Ezáltal nemcsak a kapott inzulinná való továbbfeldolgozás könnyebb, hanem meglepő módon a jó kitermelést biztosító fermentációs időknél nem észrevehető, hogy a fermentációs közegben kiváló proteázok hátrányos hatása érvényesülne.

A találmány szerinti módosítása a proinzulin molekuláknak a rövidített C-lánc révén egy egyszerű eljárást tesz lehetővé a humáninzulinná való továbbfeldolgozáshoz, amit kémiai hasítással, hidroxil-aminnal és/vagy enzimatikus hasítással tripszinnel vagy előnyösen lizil-endoproteinázzal végzünk. Az enzimatikus hasítás az előnyös. A lizil-endoproteinázok specifikusan karboxil-terminálisan a lizin aminosav után hasítanak. A találmány szerinti eljárással előállított fúziós fehérjékben az A- és B-láncok kedvező elrendezése miatt az említett enzimek hatására olyan inzulin előtermék képződik, amelyben meglepetésszerűen a diszulfid-hidak helyesen vannak kapcsolva.

A génszerkezetekben célszerűen a tendamistat-rész és a proinzulin molekula kezdete között olyan hídtagot biztosítunk, amely a proinzulin-származéknak a tendamistat-részről való lehasítását ugyanazzal az enzimmel teszi lehetővé, amely a proinzulin-származéknak a két inzulinláncba való hasításához szolgált.

Ha a találmány szerinti fúziós fehérjét egy lizil-endopeptidázzal hasítjuk, akkor a módosított C-lánc konstrukciójától függően Dez-B^{30}-inzulint nyerünk, amely átpeptizálással humán inzulinná alakítható, vagy B^{31}-Lys-inzulint vagy B^{31}-Lys-B^{32}-Lys-inzulint nyerünk, amelyek például karboxipeptidáz B-vel humáninzulinná alakíthatók.

Különösen jó kitermelést érünk el a kívánt fehérjére vonatkozóan, ha a génszerkezetet egy rövidített tendamistat génnel helyettesítjük. Ezen előnyös kiviteli formának az az előnye, hogy a módosított inzulin kb. a felét teszi ki a fúziós fehérjének, azaz az kevesebb ballasztot tartalmaz. A fúziós fehérje helyes hajtogatottságát a tendamistat-rész rövidítése nem befolyásolja, így a találmány szerint nyert kisebb fúziós fehérjék is igen előnyösen feldolgozhatók. Ugyancsak nem mutatható ki, hogy a fehérjék gazda-proteázokkal könnyebben lebonthatók lennének, sőt ezekkel szemben meglepetésszerűen nagyobb stabilitás mutatkozik.

A találmány szerinti eljárásnál számos, előnyös génszerkezet alkalmazható, amelyek mind olyan inzulin-előtermékhez vezetnek, amelyek a fúziós fehérje ballasztanyagától könnyen elválaszthatók. A könnyű feldolgozhatóság következtében a humáninzulin kihozatala tovább növelhető.

A fúziós fehérjének a tenyészközegtől való elválasztását, az inzulin előtermékké való tovább-feldolgozását, valamint a humáninzulinná való átalakítását ismert eljárások szerint végezzük. Így például a fúziós fehérjéket előnyösen adszorpciós- vagy ioncserélő kromatográfiával és/vagy gélszűréssel izoláljuk és a proinzulin részt kémiailag vagy előnyösen enzimatikusan hasítjuk. A megfelelő hídtag konstrukciója általában ismert, például a 229 998–A számú európai szabadalmi leírásban van leírva.

A 089 007–B számú európai szabadalmi leírásban analóg pre-proinzulinok és proinzulinok vannak leírva, amelyeknél a preláncon (illetve a proinzulin N-terminálisán) Lys vagy Arg tag van (amely a találmány szerinti eljárással nyert konstrukció esetében is előnyös), amelyeknek B-lánca B^{29}-Lys-taggal végződik és amelyeknél a C-peptid Lys vagy Arg tagra rövidítve lehet úgy, hogy a proinzulinszerkezetben a legegy-

szerűbb esetben a B^{29}-Lys után csak Lys vagy Arg következik és az A-lánc ehhez kapcsolódik. Ezek a vegyületek elővegyületként szolgálnak inzulinnak tripszinnel vagy tripszinhez hasonló endopeptidázokkal és egy adott esetben védőcsoporttal ellátott természetes aminosav-észterrel végzett előállításához.

A 195 691 A-számú európai közrebocsátási iratból olyan inzulin előtermékek ismertek, amelyek B és A lánca egy -X-Y-hídtaggal van összekötve, amelyben X és Y azonos vagy különböző és Lys vagy Arg jelentésű. Ezen inzulin előtermékeket élesztőből nyerik ki, majd enzimatikus átalakítással humán inzulinná alakítják. Rövidített C-láncú inzulin előtermékek ismertek továbbá a 163 529 számú európai szabadalmi leírásból is. A 132 769 és 132 770 B számú európai szabadalmi leírásokban inzulinszármazékokat és ilyeneket tartalmazó gyógyszerkészítményeket ismertetnek.

A következő példákkal a találmány szerinti eljárást közelebbről ismertetjük. Amennyiben másképpen nem jelöljük, a százalékos adatok tömeg%-ot jelentenek. A példák szerinti géntechnológiai manipulációs módszerek pl. a következő irodalmi helyen vannak részletesen ismertetve: Moniatis és mtársai: „Molecular cloning". A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.

Az ábrán az 1. példa szerinti génszerkezetet mutatjuk be.

1. példa

Az 1. táblázat szerinti szintetikus gént (1) önmagában ismert módon foszfoamidit módszer szerint kémiai úton szintetizáltuk. A kódkiválasztáshoz Streptomycetesben G és C volt preferálva a 3 714 866 A1 számú NSZK-beli közrebocsátási irat 2. táblázatban ismertetett majom proinzulint kódoló génhez hasonlóan, az 1. táblázat szerinti (1) gén az 5'-végén az EcoRI restrikciós enzim hasítóhelyének szekvenciáját mutatja. A szerkezeti gén után két záró kód és egy linker-szekvencia, a SalI enzim számára felismerhető hellyel, következik. A 3'-végén van a HindIII restrikciós enzim hasítóhelyének megfelelő átnyúló szekvencia.

A kereskedelmi forgalomban beszerezhető pUC19 plazmidot az EcoRI és HindIII enzimekkel hasítjuk és az (1) szintetikus génnel ligáljuk. Ily módon nyerjük a (2) pI1 plazmidot. A beépítés után a szintetikus gént az EcoRI-gyel és SalI-gyel (3) fragmensként hasítjuk és a továbiakban leírt szerkezeteknél alkalmazzuk.

A pUC19 plazmidot az SmaI-gyel teljesen emésztjük és a 2. táblázatban megadott (4) terminátor szekvenciával ligáljuk. Az így kapott, ezt a szekvenciát a helyes orientációban tartalmazó plazmidot pT1 (5)-ként jelöljük. Ezt az (5) plazmidot EcoRI-gyel nyitjuk és a vágási helyet DNS-polimerázzal (Klenow fragmens) kitöltjük. Ily módon nyerjük a (6) plazmidot, melyet SalI-gyel és SphI-gyel nyitunk és a (7) nagy fragmenst izoláljuk.

A pKK400 (8) plazmidot 3 714 866 A1 számú NSZK-beli közrebocsátási irat, 4. ábra (20) SphI-gyel és EcoRI-gyel nyitjuk és a (9) kis fragmenst a tendamistat génnel együtt izoláljuk.

A (3), (7) és (9) fragmensek ligálásával nyerjük a pKK500 plazmidot (10), amelyben a tendamistat szekvencia után a 12 aminosavat kódoló hídtag:

```
Phe Asn Ala Met Ala Thr Gly Asn Ser Asn Gly Lys
TTC AAT GCG ATG GCC ACC GGG ATT TCG AAC GGC AAG
AAG TTA CGC TAC CGG TGG CCC TAA AGC TTG CCG TTC
                        EcoRI
```

következik, majd ezt a találmány szerint módosított proinzulinhoz szükséges gén követi. A helyes elrendezést SphI-gyel és SstI-gyel végzett hasítással lehet ellenőrizni, amikor is a kb. 3,5 kb nagyságú plazmidból egy 833 bp fragmenst nyerünk. A szekvencia helyességét a didezoxi-módszerrel végzett DNS-szekvenálással bizonyítjuk.

Olyan génszerkezeteket, amelyekben a C-peptidként működő Lys tagot egy további Lys taggal egészítünk ki, hasonlóképpen állítjuk elő, ehhez a Lys-t kódoló AAG kodont megduplázzuk, amikor is a pI1 plazmidot, majd ebből a pKK600 plazmidot nyerjük.

2. példa

A 3 714 886 A1 számú NSZK-beli szabadalmi leírásban leírtakhoz hasonlóan (pGF1 vektor) a pKK500 és pKK600 vektorokból előállítjuk a pGF2 és pGF3 expressziós plazmidokat. Ehhez a pKK500 és pKK600 vektorokat kettős emésztéssel, SphI-gyel és SatI-gyel emésztjük, a 823 és 826 bp inszertumot izoláljuk és ezeket a DNS fragmenseket azonos enzimmel hasított pIJ702 expressziós plazmidba ligáljuk. A ligációs keveréket S. lividans TK 24-be (hozzáférhető: The John Innes Foundation, Norwich, Anglia; részletes leírása: D. A. Hapwood és mtársai: „Genetic Manipulation of Streptomyces". A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich, 1985.) transzformáljuk és a plazmid-DNS-t a tendamistat aktivitást mutató (lemez teszt) tiosztrepton rezisztens transzformánsokból izoláljuk. Minden pozitív klón tartalmazza az alkalmazott, pKK500-ból és pKK600-ból álló inszertumot.

A kódolt fúziós fehérje expresszióját ismert módon lehet követni. A transzformált S. lividans TK 24 törzset négy napon át 28 °C hőmérsékleten rázólombikban inkubáljuk, a micéliumot a tenyészközegtől centrifugálással elválasztjuk és a kapott tiszta oldatból a fúziós fehérjét a következőképpen kimutatjuk:

10–100 µl oldatot 20–200 µl 15%-os triklór-ecetsav oldattal elkeverünk, a kiváló fehérjét centrifugálással elválasztjuk, mossuk és SDS-tartalmú pufferoldattal [U. Laemmli, Nature, 227 (1970) 680–685] felvesszük. Két percig 90 °C hőmérsékleten inkubáljuk és elektroforetikusan 10–17%-os SDS-poliakrilamidgélen elválasztjuk, amikor is 15 kD molakulatömegű fehérjét nyerünk, amely a tendamistatból és proinzulinból álló fúziós fehérje várt molekulatömeg tartományába esik.

A fúziós fehérje a tendamistat elleni antitestekkel, valamint az inzulin elleni antitestekkel egyaránt reagál.

3. példa

pTF2 expressziós vektort (3 714 866 A1 számú német szövetségi köztársaságbeli közrebocsátási irat 4. példa) EcoRI és SstI restrikciós enzimekkel emésztünk és a majom-proinzulint kódoló fragmenst eltávolítjuk. A kapott 5,65 kbp nagyságú fragmenst az alábbi leírt ligálási reakciónál alkalmazzuk.

Az 1. példa szerinti pKK500 plazmidból azonos restrikciós enzimmel egy 285 bp nagyságú DNS-fragmenst hasítunk, amely a rövidített proinzulin gént valamint a terminátor szekvenciát tartalmazza.

A pTF2-ből nyert 5,65 kbp nagyságú fragmens és pKK500-ból nyert 285 bp nagyságú fragmens ligálásával nyerjük a pTF3 expressziós plazmidot.

Ha Streptomyces lividans TK24 protoplasztokat a ligációs keverékkel transzformálunk, olyan klónokat nyerünk, amelyek tiosztrepton rezisztensek és egy fúziós fehérjét választanak ki, amely proinzulin elleni antitestekkel reagálni képes. Ez a fúziós fehérje a tendamistat első 41 aminosavjából, a

Pro-Ser-Leu-Asn-Ser-Asn-Gly-Lys

hídtagból és a rövidített proinzulinból áll.

A találmány szerinti eljárásunk előnye a jó feldolgozhatóságon kívül – mint azt már korábban is említettük –, a jó kitermelés a kívánt fehérjére vonatkozóan. Ez esetünkben 20–100 mg/l fehérjét jelent, ami jelentős mértékben felülmúlja pl. a 195 691 számú európai szabadalmi leírás eljárása szerint nyerhető fehérje mennyiségét, ami ott az 1. táblázat No. 9. példája szerint kb. 12 mg/l, ami az ott megadott 2 μmól/l értéknek felel meg.

1. táblázat

```
                        B1              10
ASN SER ASN GLY LYS PHE VAL ASN GLN HIS LEU CYS GLY SER HIS
AAT TCG AAC GGC AAG TTC GTC AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCG CAC
     GC TTG CCG TTC AAG CAG TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGC GTG
(EcoRI)
                  20                                    30
LEU VAL GLU ALA LEU TYR LEU VAL CYS GLY GLU ARG GLY PHE PHE
CTC GTG GAG GCC CTC TAC CTG GTG TGC GGG GAG CGC GGC TTC TTC
GAG CAC CTC CGG GAG ATG GAC CAC ACG CCC CTC GCG CCG AAG AAG
                       C  A1          40
TYR THR PRO LYS THR LYS GLY ILE VAL GLU GLN CYS CYS THR SER
TAC ACC CCC AAG ACC AAG GGC ATC GTG GAG CAG TGC TGT ACG TCC
TTG TGG GGG TTC TGG TTC CCG TAG CAC CTC GTC ACG ACA TGC AGG
                  50
ILE CYS SER LEU TYR GLN LEU GLU ASN TYR CYS ASN STP STP
ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTC GAG AAC TAC TGC AAC TAG TAA
TAG ACG AGG GAG ATG GTC GAG CTC TTG ATG ACG TTG ATC ATT

GTC GAC CTG CAG CCA
CAG CTG GAC GTC GGT TCG A
SalI                (HindIII)
```

2. táblázat

5'-OGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGGATC
GCTATTTGGCTATGTTAATTTCCGAGGAAAACCTCGGAAAAAAAAACCTCTAAAAGTTGCACCTAG-5'

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

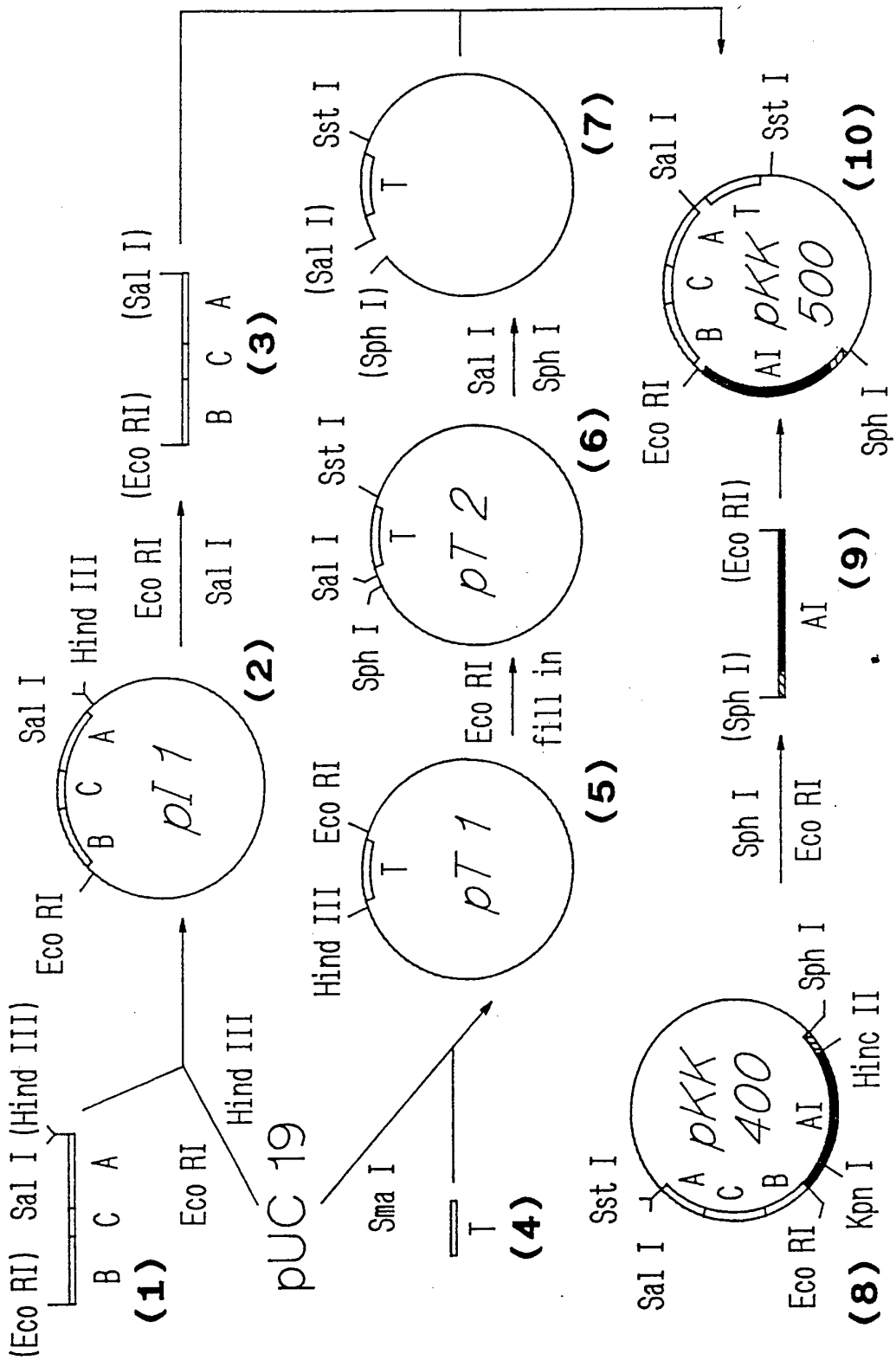
1. Eljárás inzulin előtermék előállítására fúziós fehérje formájában Streptomycetes gazdasejtben, *azzal jellemezve,* hogy egy, adott esetben módosított, tendamistat génhez az inzulin B-láncát az A lánccal egy Lys-t vagy Lys-Lys-t kódoló hídtaggal összekötő proinzulin struktúrgént kapcsolunk, kívánt esetben egy összekötő oligonukleotid hídtaggal, a kapott génszerkezetet expressziós plazmidba építjük, az expressziós plazmiddal egy Streptomyces lividans gazdasejtet transzformálunk, a gazdasejtet tenyésztjük, és a szekretálódó fúziós fehérjét a tenyészközegből kinyerjük.

Elsőbbsége: 1988. 11. 03.

2. Eljárás inzulin előtermék előállítására fúziós fehérje formájában Streptomycetes gazdasejtben, *azzal jellemezve,* hogy egy rövidített tendamistat génhez az inzulin B-láncát az A lánccal egy Lys-t vagy Lys-Lys-t kódoló hídtaggal összekötő proinzulin struktúrgént kapcsolunk, kívánt esetben egy összekötő oligonukleotid hídtaggal, a kapott génszerkezetet expressziós plazmidba építjük, az expressziós plazmiddal egy Streptomyces lividans gazdasejtet transzformálunk, a gazdasejtet tenyésztjük, és a szekretálódó fúziós fehérjét a tenyészközegből kinyerjük.

Elsőbbsége: 1989. 08. 19.

Int. Cl.[5]: C 12 N 15/62



1. ábra