

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

**287 066**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000 - 793**

(22) Přihlášeno: **29.09.1993**

(30) Právo přednosti:  
**01.10.1992 US 1992/955539**

(40) Zveřejněno: **14.04.1994**  
**(Věstník č. 4/1994)**

(47) Uděleno: **26.06.2000**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16.08.2000**  
**(Věstník č. 8/2000)**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/58**  
**C 12 P 21/06**

(73) Majitel patentu:

**ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN,  
US;**

(72) Původce vynálezu:

**Atkinson Paul Robert, Indianapolis, IN, US;  
Hilton Matthew Dale, Indianapolis, IN, US;  
Lambooy Peter Karl, Indianapolis, IN, US;**

(74) Zástupce:

**Švorčík Otakar JUDr., Hájkova 2, Praha 2, 12000;**

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy polypeptidového produktu**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy polypeptidového produktu s dipeptidylaminopeptidázou, izolovanou z Dictyostelium discoideum. Způsob přípravy polypeptidového produktu odstraněním dipeptidů z aminového zakončení prekurzorového polypeptidu kdy, se uvede do styku prekurzorový polypeptid, mající sudý počet aminokyselin vázaných na peptidovou vazbu, která je po odstranění uvedených dipeptidů aminovým zakončením polypeptidového produktu, s dipeptidylaminopeptidázou o molekulové hmotnosti 225 000, izolovanou z Dictyostelium discoideum s optimální hodnotou pH 3,5 za specifických podmínek pro působení enzymu dDAP k sekvenčnímu odstranění aminokoncových dipeptidů ze zpracovávaného prekurzorového polypeptidu.

**CZ 287066 B6**

## Způsob přípravy polypeptidového produktu

### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy polypeptidového produktu s dipeptidylaminopeptidázou, izolovanou z *Dictyostelium discoideum*. Dipeptidylaminopeptidáza, izolovaná ze slizovky *Dictyostelium discoideum* (enzym, způsob jeho přípravy a jeho použití jsou předmětem základní zveřejněné PV 2033-93) je užitečná při zpracování rekombinantně produkovaných biologických sloučenin.

### Dosavadní stav techniky

*Dictyostelium discoideum* je primitivní eukaryotický mikroorganismus běžně nazývaný slizovka nebo lépe buněčná slizovka. Označení je odvozeno od dvou extrémních stavů mikroorganismu z makroskopické perspektivy. Při skutečném růstu roste *Dictyostelium discoideum* jako jednobuněčná amoeba. V tomto stupni nemá žádnou buněčnou stěnu a její vzhled proto připomíná tenký film (nebo sliz). Po vyhladovění na pevném médiu se nezávislé buňky agregují za vytvoření kolonie. Tato kolonie má charakter multibuněčného organismu tím, že migruje ve formě označované jako slimák, a pak se diferencuje s pozdějšími buňkami slizu tvořícího nohu, přičemž přední buňky vytvářejí nožku a střední buňky vytvářejí plodnici. Organismus se v přírodě vyskytuje na povrchu půdy a hnoje. Divoký typ amoeby získává živiny výlučně vstřebáváním (fagocytosou) celou bakterií; proto se někdy označuje jako masožravý. Byly izolovány axenické mutanty *Dictyostelium discoideum*, které jsou schopny růstu bez současné kultivace „potravinových“ bakterií a které proto mohou růst na rozpustném prostředí.

Dipeptidylaminopeptidázy (DAP) jsou enzymy, které hydrolyzují předposlední aminokoncovou peptidovou vazbu za uvolňování dipeptidu z neblokovaného aminového zakončení peptidů a bílkovin. V současné době jsou známy čtyři dipeptidylaminopeptidázy (označované jako DAP-I, DAP-II, DAP-III, DAP-IV), které se rozlišují na základě svých fyzikálních charakteristik a míry, kterou katalyzují štěpení s různými peptidovými sekvencemi a aminozakončením. Dipeptidylaminopeptidáza DAP-I je poměrně nespecifická DAP, která katalyzuje uvolňování mnohých dipeptidových kombinací z neblokovaného aminového zakončení peptidů a bílkovin. Dipeptidylaminopeptidáza DAP-I vykazuje malou aktivitu nebo nevykazuje žádnou aktivitu, když je vznikajícím dipeptidem X-Pro, Arg-X nebo Lys-X (kde X znamená aminokyselinu). Dipeptidylaminopeptidáza DAP-II vykazuje preferenci pro aminově zakončené dipeptidové sekvence, které začínají Arg-X nebo Lys-X a v menší míře X-Pro. DAP-II vykazuje výrazně nižší míru štěpení proti většině jiných dipeptidových kombinací. Zdá se, že dipeptidylaminopeptidáza DAP-III má sklon k aminokyselinovému zakončení dipeptidových sekvencí formy Arg-Arg a Lys-Lys. Dipeptidylaminopeptidáza DAP-IV vykazuje nejvyšší stupeň hydrolytické aktivity se zřetelem na dipeptidové sekvence formy X-Pro. Dipeptidylaminopeptidasové (DAP) enzymy, zejména DAP-I a DAP-IV jsou užitečné při zpracování bílkovin. Předložený vynález se týká způsobu přípravy polypeptidového produktu s dipeptidylaminopeptidázou, izolovanou z *Dictyostelium discoideum*.

### Podstata vynálezu

Podstatou předloženého vynálezu je způsob přípravy polypeptidového produktu odstraňováním dipeptidů z aminového zakončení prekurzorového polypeptidu, kdy se uvede do styku prekurzorový polypeptid, mající sudý počet aminokyselin vázaných na peptidovou vazbu, která je po odstranění uvedených dipeptidů aminovým zakončením polypeptidového produktu, s dipeptidylaminopeptidázou o molekulové hmotnosti 225 000, izolovanou z *Dictyostelium discoideum* s optimální hodnotou pH 3,5 za specifických podmínek pro působení enzymu dDAP

k sekvenčnímu odstranění aminokoncových dipeptidů ze zpracovávaného prekurzorového polypeptidu.

Nový dipeptidylaminopeptidasový enzym dDAP vykazuje účinnost, která je poněkud podobná účinnosti DAP-I a DAP-III, je však vysoce odlišná od těchto enzymů svými fyzikálními a jinými enzymatickými charakteristikami. Vynález se týká způsobu použití DAP enzymu k odstraňování dipeptidů z N-zakončení rekombinantně produkovaného prekurzoru bílkovin nebo peptidů. Enzymu dDAP podle předloženého vynálezu se může používat pro odstraňování jednotlivých dipeptidů z N-zakončení polypeptidů a také se ho může používat k sekvenčnímu odstraňování více než jednoho dipeptidu z N-zakončení prekurzorových polypeptidů.

10 Používané symboly a zkratky mají následující významy:

dDAP - dipeptidylaminopeptidáza, izolovaná z *Dictyostelium discoideum*, která vykazuje optimum hodnoty pH = 3,5 s GFpNA jakožto substrátem a má molekulovou hmotnost 225 000 měřeno analytickým ultraodstředěním a subjednotkovou molekulovou hmotnost 66 000 měřeno SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézou.

15 GFpNA - Gly-Phe p-nitroanilid.

Prekurzorový polypeptid - rekombinantně produkovaný polypeptid, který obsahuje stejný počet aminokyselin za aminovým zakončením žádaného polypeptidu.

Zpracovávaný polypeptid - polypeptid získaný odstraněním N-koncového dipeptidu nebo dipeptidů k získání žádaného polypeptidu.

20 RRBNA - Arg-Arg-beta-naftylamid.

Všechny používané zkratky aminokyselin v popise vynálezu jsou schválené americkým Úřadem pro patenty a obchodní známky, uvedené v platnost 37 C.F.R.-1.822 (b) (2) (1990).

Enzym dDAP podle vynálezu je nejužitečnější pro převádění prekurzorových polypeptidů na zpracovávané polypeptidy.

25 Prekurzorové polypeptidy, které se mohou zpracovávat enzymem dDAP lze uvést Met-Arg-hGH, Met-Tyr-proinzulin, Met-Arg-proinzulin, Met-Arg-proinzulinový analog (B28 Lys, B29 Pro), Met-Tyr-proinzulinový analog (B28 Lys, B29 Pro), Met-Arg-proinzulinový analog (B10 Asp, des B28-30), Met-Tyr-proinzulinový analog (B10 Asp, des B28-30). Inzulinový analog (B28 Lys, B29 Pro) je popsán v evropské přihlášce vynálezu EP 90301224.3, zatímco inzulinový  
30 analog (B10 Asp, des B28-30) je popsán v evropské přihlášce vynálezu EP 92305678.2. Vyjma toho, lze používat enzymu dDAP k sekvenčnímu odstraňování více než jedné sady dipeptidů z N-zakončení prekurzorových polypeptidů. Zpracování Met-Arg-proinzulinu a Met-Arg-proinzulinových analogů pomocí hovězího DAP-I popsali Becker a kol. v US patentovém spise 5 126 249, zveřejněném 30.6.1992.

35 Použití enzymu dDAP k odstranění dipeptidů prekurzorových bílkovin je výhodné v tom, že dDAP má optimum při hodnotě pH 3,5, která umožňuje provádění reakce v kyselé oblasti, kdy jsou četné prekurzorové polypeptidy rozpustné. Kromě toho konverze některých prekurzorových polypeptidů při neutrální nebo větší hodnotě pH může vést k vyšší míře meziřetězcových disulfidických dimerů nebo polymerů substrátu s doprovodnou ztrátou výtěžku produktu. Tento  
40 jev známý jakožto disulfidické „scrambling“ je obzvláště nepříjemný, když se používá hovězího DAP-I, jelikož DAP-I vyžaduje přidávání redukčních činidel, například beta-merkaptioethanolu nebo cysteinu do reakční směsi. V kyselé oblasti hodnot pH dochází rovněž k oxidaci methioninových zbytků nižší měrou. Kromě toho je ekonomicky snadnější používat enzymu z fermentační kultury *Dictyostelium discoideum*, než se spoléhat na provozní produkci enzymů  
45 z živočišných zdrojů, jelikož fermentační technologie umožňuje větší konzistenci produktu a reprodukovatelnost enzymu. Vyloučení enzymů na živočišné bázi představuje konstantní zdroj vysoce čistého základního materiálu. Fermentace *Dictyostelium discoideum* Ax3 (ATCC 28368) následovaná odstředěním, ionexovou chromatografií, hydrofobní interakční chromatografií

a vylučovací chromatografií vede k vysoce vyčištěnému roztoku dDAP enzymu, který se může ukládat nebo bezprostředně používat pro zpracování prekurzorových polypeptidů.

Konverze prekurzorových polypeptidů na zpracovávané polypeptidy se může provádět v širokém rozmezí teplot, hodnot pH a v širokém časovém rozmezí. Reakce se zpravidla provádí ve vodném vhodně pufovaném prostředí k získání a k udržení hodnoty pH 2, až 5,5. Pro výhodné provedení je hodnota pH 3,0 až 4,5 a zejména 3,0 až 3,5. Optimální hodnota pH se může mírně měnit podle substrátu. Například zpracování Gly-Phe-pNA a Gly-Arg-pNa probíhá nejrychleji při hodnotě pH 3,5, zatímco rychlost zpracování Met-Asp-hGH probíhá lépe při hodnotě pH 3, až 3,5.

Zpracování Arg-Arg-βNA probíhá nejrychleji při hodnotě pH 4,5. Pracovník v oboru snadno stanoví optimální hodnotu pH pro každou specifickou reakci na základě charakteristik jako je stabilita a rozpustnost daného prekurzorového polypeptidu a enzymu. V některých případech se může použít solubilizačního činidla, jako je například močovina, dodecylsulfát sodný a guanidin.

Reakci zpracování lze nechat proběhnout po libovolný časový úsek, od pouze několika sekund až po několik dní. Výhodně reakce probíhá od 1 minuty až po 24 hodin, výhodněji zejména od 1 hodiny do 8 hodin. Zručný pracovník v oboru pozná na jakou dobu lze reakci nastavit pro splnění jakéhokoliv parametru pro jakýkoliv žádaný prekurzorový polypeptid nebo zpracovávaný polypeptid.

Teplota zpracovávací reakce se může také nastavit podle daného substrátu. Výhodně se reakce nechá probíhat při teplotě od 15 do 45 °C. Výhodněji se je teplota zpracovávací reakce mezi 20 až 37 °C, zejména je teplota reakční směsi 25 až 37 °C. Opět zručný pracovník v oboru lehce určí reakční parametry jako je doba, teplota a hodnota pH, které se mohou měnit podle potřeby dle žádaného prekurzoru nebo zpracovávaného polypeptidu.

Při popisovaném způsobu se může použít nejrůznějších pufrů, jediným požadavkem je udržení hodnoty pH v žádaném rozmezí. Příklady typických pufrů jsou fosforečnan sodný, octan sodný, citran sodný, glycin a podobně. Výhodné pufrů jsou octan sodný, fosforečnan sodný a glycin.

Prekurzorové polypeptidy pro provádění způsobu podle předloženého vynálezu se obecně připravují pomocí rekombinantní DNA technologie. Během jejich přípravy je získána nukleotidová sekvence kódující požadovaný prekurzorový polypeptid za použití rutinních technik pro tyto syntézy.

Tyto způsoby obvykle zahrnují přípravu oligonukleotidů kódujících jak fragmenty požadované kódující sekvence, tak jejich komplementární sekvence. Oligonukleotidy jsou určeny pro zajištění překrytí jednoho fragmentu kódující sekvence se dvěma fragmenty komplementární sekvence a naopak. Oligonukleotidy se párují a spojují, což nakonec vede k vytvoření požadované genové sekvence.

Sekvence se včlení do klonovacího vektoru v místě, které dovoluje, aby byl exprimován produkt, který je jí kódován. Vhodné klonovací vektory obsahují alespoň část řídicí sekvence exprese.

Následující příklady jsou podány jako prostředek pro ilustraci předloženého vynálezu. Příklady neomezují žádným způsobem předmět předloženého vynálezu.

#### 40 Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

##### Fermentace Dictyostelium discoideum

Lyofilizované kultury Dictyostelium discoideum Ax3, získané z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod označením ATCC 28368 se nanosou v různé hustotě na agarové destičky (1,2 % Difco Bacto Agar) obsahující pufované prostředí kvasničný extrakt-

pepton o složení (uváděném v g/l): Difco Yeast Extract (kvasničný extrakt Difco) (7,15), Difco Bacto Peptone (14,3),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,51) a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,49), do kterého se přidá asepticky glukosa (10 g/l) po oddělené sterilizaci a s hodnotou pH upravenou na 6,5 ( $\pm 0,1$ ) hydroxidem sodným nebo kyselinou sírovou. Totéž prostředí (bez agaru) se používá pro růst kapalně kultury v objemech menších než přibližně jeden litr. Agarové destičky se inkubují po dobu 3 až 5 dní při teplotě 21 až 24 °C. Z destiček se sklídí spóry, které se opatrují k předcházení snímání „potravinového bakterie“ lyofilizovaného s Ax3 kulturou, pak se naočkují do 3 ml pufrované půdy kvasničný extrakt-peptonový bujon a inkubují se za mírného protřepávání při teplotě 21 až 24 °C. Pak se násobí buňky *Dictyostelium discoideum* sériovým přenosem postupně větších objemů pufrované půdy pepton-kvasničný extrakt. Každý sériový stupeň přenosu je za přibližně 10 až 25 násobného zředění a probíhá, když hustota buněk překročí přibližně  $2 \times 10^6$  ml. Půdy se vždy inkubují při teplotě 21 až 24 °C za mírného míchání.

Míchané fermentace se zpravidla provádějí v podobném prostředí se sójovým peptonem (například Phytone Peptone nebo Marcor Soy Peptone) o koncentraci 2 až 14,3 g/l místo peptonu Bacto Peptone v počátečním prostředí pepton-kvasničný extrakt. Sklízí se zpravidla z fermentorů s pracovním objemem 10 až 5000 litrů, vybavených 1 až 3 turbinovými míchadly Rushton o počtu otáček 40 až 150 za minutu. Pracuje se při teplotě  $22 \pm 1$  °C za řízeného průtoku vzduchu 0,1 až 0,5 objemů vzduchu na objem kapalně půdy a za tlaku 20,7 až 34,4 kPa. Některé fermentace se provádějí při hodnotě pH 6,4 nastavené kyselinou sírovou a některé rozpuštěným kyslíkem řízeným na 40 až 60 % řízením míchání a průtoku vzduchu. Dbá se o to, aby docházelo k minimálnímu stříhu při manipulaci a fermentaci buněk, aby stěny byly prosty amoeb v průběhu růstu.

Obecně se míchané kultury *Dictyostelium discoideum* Ax3 zdvojnásobí v průběhu 12 až 36 hodin. Postupně se snižuje obsah rozpuštěného kyslíku (i když tento obsah není řízen), začne stoupat když přestane vzrůstat hustota buněk. Konečné hustoty buněk  $3 \times 10^6$  ml až  $5 \times 10^7$  ml zřejmě omezují přenos kyslíku v takových fermentacích s nižšími hustotami buněk.

Občas se odebírají a analyzují vzorky se zřetelem na hustotu buněk a na aktivitu GF-pNAse (viz příklad 3, infra). Používá se čítací komůrky Petroff-Hauser ke stanovení hustoty buněk nad přibližně  $5 \times 10^5$  ml. Obecně GFpNA hydrolyzační aktivita vzrůstá během průběhu fermentace. Maximální dDAP aktivita se pozoruje za 2 až 4 dny po dosažení maximální hustoty buněk. Veškerá půda se ukládá při teplotě 4 °C nebo se zmrazí na teplotu -20 °C a pak se nechá roztát a analyticky se zjišťuje aktivita. Fermentace se sklízí ochlazením na méně než 10 °C a oddělením buněk za použití odstředivky s kontinuálním průtokem.

## Příklad 2

### Aktivita dDAP

#### A. Konverzní reakce

##### 1. Štěpení GF/pNA

Enzym dDAP se normálně monitoruje podle štěpení chromogenního substrátu Gly-Pha para-nitroanilid (GF-pNA). Zkouška se zpravidla provádí zředěním enzymu 11 krát na 1,0 ml 4 mM GFpNA nastaveného na hodnotu pH 3,5. Rychlost štěpení GF dipeptidu se monitoruje při teplotě 37 °C měřením vzrůstu absorbance při 405 nm. Jedna jednotka aktivity vede k 0,90 OD změně za minutu za těchto podmínek. Stanovení jednotky za minutu je možné za předpokladu extinkčního koeficientu pro volnou pNA  $9,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  při 405 nm. Inhibiční profil enzymu dDAP se zřetelem na substrát GFpNA se porovnává s hovězím DAP-I za použití jodacetamidu a tetrathionátu draselného, sulphydrylových modifikačních činidel známých k inhibici aktivity DAP-I. Vzorky dDAP nebo hovězího slezinového DAP-I se inkubují po dobu 15 minut při teplotě místnosti v konečných koncentracích 0, 0,5, 5,0 nebo 50 mM každého inhibitoru při hodnotě pH 7 ve 100 mM pufru Tris. Inkubované roztoky se pak zředí 21 krát použitím 4 mM

GFpNA za hodnoty pH 3,5. Rychlost štěpení se monitoruje měřením vzrůstu absorbance při 405 nm při teplotě 37 °C. Rychlost hovězího DAP-I štěpení GFpNA se snižuje více než o 90 % při vystavení 5 mM jodacetamidu a z 95 % se inhibuje 5 mM tetrathionátem draselným. Není žádných známek významné inhibice dDAP při žádné z testovaných koncentrací jodacetamidu nebo tetrathionátu draselného.

Optima hodnoty pH pro GFpNA schopnost štěpení se stanovují nastavením pufru sestávajícího z 0,5 Tris, fosfátu a citrátu použitím 10% kyseliny chlorovodíkové nebo 10% roztoku hydroxidu sodného na hodnotu pH 3 až 8. Enzym dDAP se zředí 20 krát v pufru obsahujícím 100 mM cysteaminu a 10 mM chloridu sodného. Hovězí DAP-I se zředí 200 krát v témže pufru. Substrátový roztok GFpNA (4 mM) se připravuje v 2% dimethylformamidu. V mikrotitrové destičce se smíchá 0,025 ml pufru Tris/fosfát/citrát o různé hodnotě pH s 0,1 ml zředěného enzymu a s 0,1 ml substrátového roztoku. Míra vzrůstu absorbance při 410 nm se stanovuje na deskovém čítači („plate reader“) v průběhu 30 minut. Výsledky indikují, že optima hodnoty pH dDAP štěpení GFpNA jsou 3,5 až 4,0.

## 2. Štěpení Gly-Arg-pNA

Připraví se čtyři vzorky mM Gly-Arg-pNA (GR-pNA) v 50 mM kyseliny octové, v 50 mM glycinového pufru při hodnotě pH 5. K nastavení hodnot pH 5,1 až 2,3 se používá kyseliny chlorovodíkové nebo roztoku hydroxidu sodného. Do 180 µl shora uvedeného pufovaného substrátu se přidá 5 µl dDAP (49 milijednotek/ml konečných). Míra vzrůstu absorbance při 410 nm se monitoruje (za použití deskového čítače) a míra vzrůstu se podporovává s hodnotou pH reakčního roztoku. Jako s GF-pNA má GR-pNA substrát optimum hodnoty pH přibližně 3,5. Enzym má malou aktivitu při hodnotě pH pod 2,5 nebo nad 5 za použití tohoto substrátu.

## 3. Štěpení Arg-Arg-B-naftylamidu (RR-BNA)

Připraví se přibližně 0,25 mM (RR-BNA) nebo 0,25 mM benzyloxykarbonyl-RR-BNA (Z-RR-BNA) buď ve 100 mM kyseliny octové, hodnota pH 3,5, nebo ve 100 mM citrátového pufru, při hodnotě pH 5,0. Do 2 ml substrátu se přidá dDAP nebo hovězí DAP-I (přibližně 15 milijednotek/ml roztoku). Míra štěpení (monitorovaná vzrůstem fluorescence při 410 nm za excitace při 340 nm) se monitoruje. Hovězí DAP-I není schopen štěpit žádný substrát.

Překvapivě je dDAP schopen účinně štěpit RP-BNA substrát. Enzym dDAP není schopen štěpit blokovanou aminoskupinu Z-RR-BNA substrátu, což potvrzuje pozorování, že dDAP je DAP enzym. Optimální hodnota pH pro štěpení RR-BNA se zkouší monitorováním rychlosti RR-BNA štěpení za použití systému pufru sestávajícího z 50 mM kyseliny octové a 50 mM citrátu. Různé hodnoty pH se nastavují použitím kyseliny chlorovodíkové nebo roztoku hydroxidu sodného a 1,5 ml objemů se upravuje na 2,0 s 0,5 ml- 1 mM zásobního roztoku RR-BNA (konečná koncentrace přibližně 0,25 mM). Enzym dDAP se přidává (do přibližně 15mU/ml) a stanovuje se míra štěpení. Optimální hodnota pro štěpení RR-BNA je přibližně 4,5 s výraznou aktivitou v celém zkoušeném rozmezí (hodnota pH 3,5 až pH 5,7). Tento překvapivý výsledek napovídá, že enzym dDAP má některé vlastnosti DAP-III.

Pracovníkovi v oboru je jasné, že optimální hodnota pH pro štěpení substrátu závisí nejen na enzymu, ale také na samotném substrátu, to znamená na konstituci odstraňovaného dipeptidu, jakož také na samotné indikátorové skupině. Například za použití enzymu dDAP, má Gly-Arg-pNA optimální hodnotu pH přibližně 3,5, zatímco optimální hodnota pH pro štěpení Gly-Arg-7-amido-4-methylkumarinu (GR-AMC) je přibližně 5, což znamená, že příslušná skupina může ovlivňovat vlastnosti štěpení.

## B. Konverze syntetických oktapeptidů a dekaeptidů

Oktapeptid Met-Asp-Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu se rozpustí na koncentraci 4 mM s 50 mM kyseliny octové za hodnoty pH 3,5. Roztok se zředí na 1 : 1 dDAP (10mU/ml) a inkubuje se při teplotě místnosti po dobu šesti hodin. Reakce se ukončí zředěním 20 násobkem v 7 M močovíně

obsahující 1 % kyseliny fosforečné. Vzorek s ukončenou reakcí se analyzuje vysokovýkonostní reverzní fázovou (HPCL) chromatografií. Štěpné produkty se porovnávají se standardním oktapeptidem, Met-Asp dipeptidem a s Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu hexapeptidem. dDAP lehce odstraňuje Met-Asp dipeptid z neblokovaného aminozakončení oktapeptidu, není však schopen snadno štěpit vzniklý dipeptid Phe-Pro.

Syntetizovaný dekaeptid Met-Arg-Met-Tyr-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu se připravuje jakožto 1,7 mM zásobní roztok ve 100 mM glycinu za hodnoty pH 3,5. Do 0,5 mililitrů tohoto roztoku se přidá 8 mikrolitrů 6,4 mU/ml dDAP (připraveno ve 100 mM glycinu, hodnota pH 3,5). Každou hodinu se 5 mikrolitrů tohoto roztoku přímo vstříkuje do reverzního fázového chromatografického systému HPCL k monitorování štěpných produktů. Pro srovnání se nezávisle vstříkují Met-Arg a Met-Tyr dipeptidy jakož také Met-Tyr-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu a Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu peptidy. Enzym dDAP ochotně štěpí Met-Arg dipeptid z dekaeptidu stejně jako vzniklý Met-Tyr dipeptid. To znamená, že dipeptidy se mohou sekvenčně odstraňovat z aminozakončení dDAP.

#### C. Konverze Met-Asp lidského růstového hormonu

Met-Asp lidský růstový hormon (Met-Asp-hGH) se produkuje jako nerozpustná bílkovina v cytoplasmě E. coli. Nerozpustná bílkovina se stabilizuje, ohýbá k vytvoření vhodně disulfidicky párovaných Met-Asp-hGH a čistí se ionexovou chromatografií. Po výměně rozpouštědla je hodnota pH nastavena na 3,5. Met-Asp-hGH se ohřeje na teplotu 37 °C a stanoví se absorbance při 280 nm. dDAP se přidá v množství 6 milijednotek na mg Met-Asp-hGH.

Konverzní reakce se nechá probíhat při teplotě 37 °C za míchání přibližně 4 až 6 hodin. Reakce se může zpomalit bez nepříznivého ovlivnění použitím méně enzymu, nižší teploty nebo nižší koncentrace Met-Asp-hGH. Reakční rychlost se může zvýšit přidáním většího množství enzymu, zvýšením koncentrace Met-Asp-hGH nebo zvýšením reakční teploty. Postup konverzní reakce se monitoruje pomocí reverzní fázové chromatografie. Konverzní reakce se ukončí rychlým přidáním hydroxidu sodného za míchání při hodnotě pH 8 a přidáním 30 % (objem/objem) acetonitrilu. Reakční produkt lidského růstového hormonu, produkovaný zpracováním enzymem dDAP se podrobí extenzivní sérii analytických procedur včetně mapování peptidu, N-koncového sekvencování, hmotové spektroskopie, aminokyselinové analýzy a reverzní fázové chromatografie (HPCL). Všechna data indikují, že se použitím enzymu dDAP získá autentický lidský růstový hormon.

#### D. Konverze Met-Arg-lidského proinzulinu

Met-Arg-lidský proinzulin (Met-Arg-hPI) se produkuje jako nerozpustná bílkovina v cytoplasmě E. coli. Nerozpustná bílkovina se solubilizuje v 7 M močovíně. Bílkovina se čistí ionexovou chromatografií. Met-Arg-hPI se sulfityluje, rozpouštědlo se zamění a ohýbá se k vytvoření nativních disulfidických vazebných párů a nativní terciální struktury. Materiál se dále čistí za použití reverzní fázové chromatografie. Vytvoří se oxidovaný methionyl (Met(O))-Arg-hPI z Met-Arg-hPI za použití peroxidu vodíku a následně se čistí za použití reverzní fázové chromatografie a lyofilizuje se.

Met-Arg-hPI je přibližně 24 mg/ml (v přibližně 20 mM glycinovém pufru, pH 3,5). Přibližně 2,4 mg tohoto materiálu se inkubuje s 0,19 milijednotkami enzymu dDAP při hodnotě pH 3,5. Reakce se nechá probíhat při teplotě místnosti. Periodicky se odebírají podíly a zředí se 10% kyselinou fosforečnou. Tento materiál se vstříkuje na neutrální reverzní fázi systému chromatografu HPLC k monitorování zániku Met-Arg-hPI nebo (Met(O))-Arg-hPI za následné produkce hPI. Kromě toho se podíly ředí vhodným ředidlem pro umožnění HPLC monitorování vzniku buď Met-Arg, nebo (Met(O))-Arg-dipeptidu. Přibližně 60 % Met-Arg-hPI se v průběhu 8 hodin převede na hPI. Podobný výsledek se neočekávatelně pozoruje pro konverzi (Met(O))-Arg-hPI; to znamená, že se vytváří hPI. Míra štěpení obou substrátů je podobná. Tento výsledek je překvapivý jelikož hovězí DAP-I se jeví jako neschopný štěpit Met-(O)-X-deriváty hPI, kde

X znamená Arg, Phe a Tyr. Reverzní fázová analýza také dokládá, že Met-Arg dipeptid se uvolňuje z Met-Arg-hPI ve srovnání s dipeptidem Met-Arg a pík se jeví v oblasti Met-Arg dipeptidu pro zkoušku s (Met(O))-Arg-hPI substrátem, kterým může být dipeptid Met(O)-Arg. Schopnost dDAP štěpit oxidovaný Met(O)-X substrát je výraznou zpracovatelskou předností před enzymy, které nejsou schopny provádět toto štěpení.

#### E. Konverze Met-Arg-lidských proinzulinových analogů

Enzymu dDAP se také používá k účinné konverzi ohýbaného Met-Arg-lidských proinzulinového analogu (B28 Lys, B29 Pro) a ohýbaného Met-Arg-proinzulinového analogu (B10 Asp, B28-B30). Tyto reakce se provádějí v podstatě stejně, jak je vysvětleno při konverzi Met-Arg-hPI.

#### 10 Průmyslová využitelnost

Způsobu přípravy polypeptidového produktu s dipeptidylaminopeptidázou, izolovanou z Dictyostelium discoideum se používá k odstraňování dipeptidů z rekombinantně produkovaných prekurzorových bílkovin nebo peptidů.

## PATENTOVÉ NÁROKY

- 15 1. Způsob přípravy polypeptidového produktu odstraněním dipeptidů z aminového zakončení prekurzorového polypeptidu, **v y z n a ě n ý t í m**, že se uvede do styku prekurzorový polypeptid, mající sudý počet aminokyselin vázaných na peptidovou vazbu, která je po odstranění uvedených dipeptidů aminovým zakončením polypeptidového produktu, s dipeptidylaminopeptidázou o molekulové hmotnosti 225 000, izolovanou z Dictyostelium discoideum s optimální hodnotou pH 3,5 za specifických podmínek pro působení enzymu dDAP k sekvenčnímu odstranění aminokoncových dipeptidů ze zpracovávaného prekurzorového polypeptidu.
- 20 2. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se uvede do styku prekurzorový polypeptid, obsahující dipeptid vázaný na peptidovou vazbu, která je po odstranění uvedeného dipeptidu aminovým zakončením polypeptidového produktu, s dipeptidylaminopeptidázou o molekulové hmotnosti 225 000, izolovanou z Dictyostelium discoideum s optimální hodnotou pH 3,5 za specifických podmínek pro působení enzymu dDAP k sekvenčnímu odstranění aminokoncového dipeptidu ze zpracovávaného prekurzorového polypeptidu.
- 30 3. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že zpracovávaný prekurzorový polypeptid se volí ze souboru zahrnujícího prekurzor lidského proinzulinu, prekurzor lidského růstového hormonu a prekurzor analogu lidského proinzulinu.
4. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároku 3, **v y z n a ě n ý t í m**, že se prekurzorový polypeptid uvede do styku s enzymem dDAP po dobu jedné minuty až 24 hodin.
- 35 5. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároků 2 až 4, **v y z n a ě n ý t í m**, že se prekurzorový polypeptid uvede do styku s enzymem dDAP v roztoku o hodnotě pH 2,5 - 5,5.
6. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že se prekurzorový polypeptid uvede do styku s enzymem dDAP v roztoku o hodnotě pH 3,5.

7. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se prekurzorový polypeptid uvede do styku s enzymem dDAP při teplotě 15 až 45 °C.

8. Způsob přípravy polypeptidového produktu podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že N-koncovou aminokyselinou dipeptidu je oxidovaný methionin.

5

---

Konec dokumentu

---

10