

Helyspecifikus, izotóp-jelzett proteinek, aminosavak és azok
biokémiai prekursorjai és ezek előállításai eljárásai

KIVONAT

A találmány helyspecifikus izotóp-jelzett valinra, leucinra és izoleucinra és ezen aminosavak bioszintézis prekursoraira vonatkozik. Az aminosavakat ^{13}C - vagy ^{14}C -izotóp jelzéssel látják el annak a metilcsoportnak a szénatomján (szénatomjain), amely a karboxilcsoporttól a legtávolabb van. A találmány ezen jelzett aminosavak biokémiai prekursorjaira, a 2-keto-4-(^nC)-vajsavra és a 2-keto-3-(^nC -metil)-4-(^nC)-vajsavra is vonatkozik, ahol n értéke minden előfordulásakor 13 vagy 14. A találmány ezeket a helyspecifikus izotóp-jelzett aminosavakat tartalmazó proteinekre, protein fragmentumokra és polipeptidekre, továbbá a biokémiai prekursorok, az aminosavak és a proteinek, protein fragmentumok és polipeptidek előállításai eljárásaira is vonatkozik.

Jellemezés a szerző
P. E. W. W.

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

Helyspecifikus, izotóp-jelzett proteinek, aminosavak és azok biokémiai prekursorjai és ezek előállítási eljárásai

A jelen találmány helyspecifikus, izotóp-jelzett szerves vegyületekre és azok előállítására irányuló eljárásokra vonatkozik. Közelebbről a találmány a leucin, az izoleucin és a valin helyspecifikus, izotóp-jelzett biokémiai prekursorjaira, magukra az izotóp-jelzett aminosavakra, proteinekre, protein fragmentumokra és/vagy azokból előállított polipeptidekre és az ezekre irányuló előállítási eljárásokra vonatkozik.

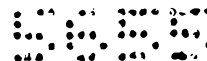
A következőkben ismertetjük találmányunk hátterét.

Az új hatóanyag vezetőmolekulák megtalálására napjainkban kifejlesztett eljárások közé tartozik a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) alkalmazása olyan vegyületek feltárására, amelyek bizonyos célmolekulához, így például egy proteinhez kötődnek (lásd például az 5 698 401 és az 5 804 390 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat (Fesik és munkatársai)). Az eljárás szerint egy olyan proteinben, amelyben a nitrogénatom helyeket ^{15}N -tel izotóp-dúsítják, meghatározzák az első két di-

menzió $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -NMR korrelációs spektrumát. Ezt az első korrelációs spektrumot a proteínre bármely potenciális ligandum vegyület(ek) távollétében kapják. Ezután egy feltételezett ligandum vegyületet vagy ilyen vélelmezett ligandum vegyületek elegyét az izotóp-dúsított proteinnel elegyítik, és egy második NMR korrelációs spektrumot kapnak. A két spektrumot összehasonlítják, és a különbség a két spektrum között információt nyújt (1) a ligandum és a gazda proteín közötti kötés létezéséről, (2) a kötés helyéről/helyeiről és (3) a kötés erősségéről.

A Fesik és munkatársai által a fentebb hivatkozott szakirodalmi helyen ismertetett eljárás olyan célmolekulákat alkalmaz, amelyeket az NMR által detektálható ^{15}N spin-magokkal izotóp-dúsítottak. Ez az eljárás a kívánt proteín, proteín fragmentum vagy polipeptid expresszáására egy megfelelő mikroorganizmus genetikai módosításán, majd a módosított mikroorganizmus olyan tápközegben való tenyésztésén alapul, amely fém és ^{15}N -jelzett tápanyagokat tartalmazó nitrogén beépíthető forrásait tartalmazza. A nitrogénforrást az aránylag olcsó, kereskedelmi forgalomban kapható ^{15}N -ammóniumsók biztosítják.

Azonban ezen NMR hatóanyag feltárási eljárás alkalmazását ^{13}C -mal izotóp-dúsított célmolekulákhoz két hátrány gátolta. Először, viszonylag költséges ^{13}C -dúsított célmolekulákat előállítani bármely hasznosítható mennyiségben. Például a proteinek előállítása a kereskedelmi forgalomban kapható, egyenletesen jelzett glükózt (glükóz- $^{13}\text{C}_6$) tartalmazó tápközegben tenyésztett genetikailag módosított mik-



roorganizmusok által költséges. A jelen szabadalmi bejelentés benyújtásának időpontjában a glükóz- $^{13}\text{C}_6$ költsége körülbelül 480 dollár/gram. Hasonlóan drága az alternatív megoldás, a ^{13}C -jelzett proteinek előállítása egyenletesen ^{13}C -jelzett aminosavaknak tápközegbe való foglalásával. Másodszor, a glükóz- $^{13}\text{C}_6$ vagy a kereskedelmi forgalomban kapható, egyenletesen ^{13}C -dúsított aminosavak alkalmazásával előállított biomolekulák nem ideálisak az NMR korrelációs spektrum eljáráshoz. Egyenletesen ^{13}C -dúsított kiindulási anyagokat tartalmazó tápközegben növesztett mikroorganizmusok által expresszált biomolekulák szomszédos ^{13}C -jelzett szénatomokat tartalmaznak. Mivel az NMR-eljárás a térbeli spin kapcsolás (azaz a nukleáris Overhauser-effektus) detektálásától függ, a szomszédos ^{13}C -magok viszonylag erős spin-spin kapcsolása a kívánt mérésekkel interferál. Ennélfogva szükség van helyspecifikusan ^{13}C -dúsított aminosavak, proteinek és polipeptidek kifejlesztésére.

A továbbiakban ismertetjük találmányunk lényegét.

A találmány a leucin, az izoleucin és a valin aminosavak izotóp-dúsított helyspecifikus biokémiai prekurzoraira, továbbá magukra a helyspecifikus izotóp-dúsított aminosavakra vonatkozik. A találmány továbbá ezekből az aminosavakból származó helyspecifikus, izotóp-dúsított aminoacil-maradékokat tartalmazó proteinekre, protein fragmentumokra és polipeptidekre és ezek előállítására is vonatkozik. Az aminosavak és az aminosav bioszintézis-prekurzorok azok karboxilcsoportjától a legtávolabb levő metilcsoport szénatomján izotóp-dúsítottak ^{13}C vagy ^{14}C



izotóppal. A találmány szerinti jelzett aminosavakban nem szomszédos szénatomokat jelzünk. Abban az esetben, ha a jelző ^{13}C -izotóp, a találmány szerinti aminosavak ezért ideálisak az NMR hatóanyag feltárási eljárásban való alkalmazásra, mivel nincs interferencia a kívánt jelekkel a szomszédos atomok ^{13}C - ^{13}C spin-spin kölcsönhatása következtében. Továbbá, mivel az aminosavakat csak a metilcsoportokon látjuk el jelzéssel, a metilcsoport(ok) három mágneseesen egyenértékű hidrogénatomja erős NMR jeleket biztosít azon ^{13}C atommal/atomokkal való kapcsolás bármely hatásának vizsgálatára, amelyekhez kapcsolódnak.

Konkréten találmányunk a (I) általános képletű vegyületekre vagy azok sójára vonatkozik - a képletben R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom vagy NH_2 -csoport és R^2 helyettesítő jelentése (I/1) és (I/2) csoport. Az említett képletben R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy $^n\text{CH}_3$ csoport, a pontozott vonallal jelzett kötések vegyértékkötéseket jelentenek, m értéke 0 vagy 1 és n értéke minden előfordulásakor 13 vagy 14, a következő feltételekkel: a) amikor R^1 helyettesítő jelentése NH_2 -csoport, a második, pontozott vonallal jelölt vegyértékkötés R^1 helyettesítőhöz hiányzik, és a pontozott vonallal jelzett kötéshez kapcsolódó hidrogénatom jelen van; b) amikor R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom, a pontozott vonallal jelzett kötés által reprezentált második vegyértékkötés R^1 -hez jelen van és a pontozott vonallal jelölt kötéshez kapcsolódó hidrogénatom hiányzik; c) amikor R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom, R^2 helyettesítő jelentése B és m értéke 0; és

d) amikor R^1 helyettesítő jelentése NH_2 csoport, R^3 helyettesítő hidrogénatom vagy nCH_3 -csoport.

A találmány a helyspecifikus ^{13}C - és ^{14}C -dúsított izoleucinra (a fenti (I) általános képletű vegyület - a képletben R^1 helyettesítő jelentése aminocsoport, R^2 helyettesítő jelentése A); leucinra (a fenti (I) általános képlet - a képletben R^1 helyettesítő jelentése aminocsoport, R^2 helyettesítő jelentése B, R^3 helyettesítő jelentése nCH_3 -csoport és m értéke 1) és valinra (a fenti (I) általános képletű vegyület - a képletben R^1 helyettesítő jelentése aminocsoport, R^2 helyettesítő B, R^3 helyettesítő nCH_3 -csoport és m értéke 0) és ezen aminosavak helyspecifikus, ^{13}C - és ^{14}C -dúsított biokémiai prekursorjaira, 2-keto-4- (^nC) -vajsavra (a fenti, (I) általános képletű vegyület - a képletben R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom, R^2 helyettesítő jelentése B, n értéke 0 és R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom) és 2-keto-3- $(^nC$ -metil-4- (^nC) -vajsavra (a fenti, (I) általános képletű vegyület - a képletben R^1 helyettesítő oxigénatom, R^2 helyettesítő B, m értéke 0 és R^3 helyettesítő jelentése nCH_3 -csoport) vonatkozik. Az előzőekben n jelentése 13 (azaz ^{13}C -dúsított vegyületek) vagy 14 (azaz ^{14}C -dúsított vegyületek).

A találmány továbbá azokra a proteinekre, protein fragmentumokra és polipeptidekre vonatkozik, amelyek az alábbi aminosavak közül egyből vagy többől származó aminoacil maradékot tartalmaznak: L-2-amino-3-metil-5- (^{13}C) -pentánsav; L-2-amino-3-metil-5- (^{14}C) -pentánsav; L-2-amino-4- $(^{13}C$ -metil-5- (^{13}C) -pentánsav; L-2-amino-4- $(^{14}C$ -



-metil-5-(^{14}C)-pentánsav, L-2-amino-3-(^{13}C -metil)-5-(^{13}C)-butánsav; és L-2-amino-3-(^{14}C -metil)-5-(^{14}C)-butánsav.

A találmány kémiai eljárásokra is vonatkozik a helyspecifikus ^{13}C - és ^{14}C -jelzett biokémiai prekursor savak, a 2-keto-4-(^nC)-vajsav és a 3-(^nC -metil)-4-(^nC)-vajsav vagy azok sói előállítására, amely szerint a (IV) általános képletű vegyületet izotóp-jelzett metil-jodiddal (H_3^nCI) reagáltatjuk, így az (V) általános képletű vegyületet kapjuk, eltávolítjuk az (V) általános képletű vegyület védő terc-butil-észter- és dimetilhidrogén-csoportjait, így 2-keto-4-(^nC)-vajsavat kapunk, vagy az (V) általános képletű vegyületet izotóp-jelzett metil-jodiddal (H_3^nCI) (ahol n értéke 13 vagy 14) tovább reagáltatjuk, így a (VI) általános képletű vegyületet kapjuk, a védő terc-butil-észter- és dimetilhidrazin-csoportokat eltávolítjuk, így 2-keto-3-(^nC -metil)-4-(^nC)-vajsavat kapunk, és adott esetben a termékekből sót képzünk.

A találmány továbbá a helyspecifikus ^{13}C - és ^{14}C -jelzett aminosavak, a leucin, az izoleucin és a valin előállítási eljárásaira vonatkozik. Az eljárás szerint egy mikroorganizmust genetikailag módosítunk leucin, izoleucin, valin vagy azok elegyei közül választott aminosavat tartalmazó polipeptid expresszáására; a módosított mikroorganizmust olyan tápközegben tenyésztjük, amely a 2-keto-4-(^nC)-vajsav, a 2-keto-3-(^nC -metil)-4-(^nC)-vajsav és sóit és elegyeit tartalmazó, beépíthető szén- és nitrogénforrásokat tartalmaz; a keletkező expresszált polipeptidet izoláljuk, a polipeptidet fragmentáljuk és az egyes aminosav-



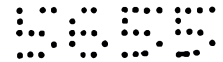
vakat izoláljuk. Az expresszált polipeptidet a szakterületen ismert hagyományos eljárásokkal, ezen belül hidrolízissel vagy enzimátikus hasítással fragmentáljuk.

A konkrét aminosav hozama maximalizálható, és a költség minimalizálható a gazda mikroorganizmus, az aminosav homopolimerjének expresszáálására történő módosításával, és a tápközegben a megfelelő izotóp-dúsított bioszintézis prekursor alkalmazásával.

A találmány továbbá a következők közül kiválasztott aminosavakból származó aminoacil maradékokat tartalmazó protein, protein fragmentum vagy polipeptid előállítására irányuló eljárásra is vonatkozik: L-2-amino-3-metil-5-⁽¹³C)-pentánsav; L-2-amino-3-metil-5-⁽¹⁴C)-pentánsav; L-2-amino-4-⁽¹³C)-metil-5-⁽¹³C)-pentánsav; L-2-amino-4-⁽¹⁴C)-metil-5-⁽¹⁴C)-pentánsav; L-2-amino-3-⁽¹³C)-metil-5-⁽¹³C)-butánsav és L-2-amino-3-⁽¹⁴C)-metil-5-⁽¹⁴C)-butánsav; az eljárás szerint egy mikroorganizmust genetikailag módosítunk egy előre meghatározott protein, protein fragmentum vagy polipeptid expresszáálására, a módosított mikroorganizmust 2-keto-4-⁽ⁿC)-vajsvat, 2-keto-3-⁽ⁿC-metil)-4-⁽ⁿC)-vajsvat és azok sóit és elegyeit tartalmazó beépíthető szén- és nitrogénforrásokat tartalmazó tápközegben tenyésztjük, és a keletkező expresszált polipeptidet izoláljuk.

A következőkben részletesen ismertetjük találmányunkat.

A természetes ¹³C izotóparánya 1,11 %, és a ¹⁴C ugyanezen aránya elhanyagolhatóan alacsony. Ezért annak valószí-



núsége, hogy bármely adott szénatom egy szerves molekulán belül ^{13}C , körülbelül 0,0111, és annak a valószínűsége, hogy bármely adott szénatom ^{14}C -izotóp, igen alacsony. Amikor célproteineket állítunk elő, az alkalmazott NMR "szűrésben" vagy a Fesik és munkatársai (lásd: fentebb) által ismerttetett hatóanyag feltárási eljárásban való alkalmazásra, szükséges, hogy a ^{13}C NMR jelet a vizsgált célmolekula természetes ^{13}C -tartalmának növelésével erősítsük. Ez végrehajtható a célmolekulának ^{13}C -izotóppal akár egyenletesen, akár szelektíven történő dúsításával. A jelen leírásban és a kapcsolódó igénypontokban alkalmazva az "egyenletes dúsítás", "egyenletesen dúsítva", "egyenletesen dúsított", "egyenletes jelzés" és "egyenletesen jelzett" kifejezések jelentése annak a valószínűségnek 0,0111 értéknél nagyobb értékre való növelése szintetikus eszközökkel, hogy a célmolekulában a véletlenszerűen kiválasztott szénatom ^{13}C -izotóp lesz. A "specifikus dúsítás", "helyspecifikus dúsítás", a "specifikusan dúsítás", "specifikusan dúsított", "specifikus jelzés" és "specifikusan jelzett" kifejezések jelentése szintetikus eszközökkel annak a valószínűségnek 0,0111-nél nagyobb értékre növelése, hogy a szénatom egy vagy több specifikus, előre kiválasztott helyen (helyeken) a célmolekulán belül ^{13}C -izotóp lesz.

Például az egyenletesen ^{13}C -dúsított glükózt tartalmazó tápközegben növesztett genetikailag módosított mikroorganizmusok által expresszált biomolekulák egyenletesen ^{13}C -izotóppal dúsítottak lesznek. Egy olyan protein, ame-



lyet ^{13}C -dúsított aminosavat tartalmazó tápközegben növesztett genetikailag módosított mikroorganizmus expresszá, az expresszált proteinben lévő alanin maradékoknál csak annak metil oldalláncán lenne specifikusan ^{13}C -izotóppal dúsított. Hasonlóan a találmány szerinti eljárással expresszált proteinek a leucin, az izoleucin és a valin oldallánc terminális metilcsoportjainál lesznek helyspecifikusan ^{13}C - vagy ^{14}C -izotóppal dúsítottak.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi helyspecifikusan jelzett leucin, izoleucin és valin, proteinek, protein fragmentumok vagy ezekből a jelzett aminosavakból előállított polipeptidek és ^{14}C - és ^{13}C -izotóppal jelzett aminosav bioszintézis prekursorok előállítását is. Az ilyen vegyületek alkalmazhatók például protein bomlási vizsgálatokban, ahol a protein bomlásának menetét és sorát regiometriás eljárásokkal szükséges követni.

Azon további kifejezések, amelyeket a jelen leírásban és a kapcsolódó igénypontokban alkalmazunk, azok általánosan elfogadott jelentései szerint értendők:

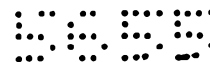
a "DTT" kifejezés jelentése: ditiotreitól;

a "HEPES" kifejezés jelentése: N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etilszulfonsav;

az "IPTG" kifejezés jelentése izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid;

a "PMSF" kifejezés jelentése α -toluolszulfonil-fluorid;

az "SCD" kifejezés jelentése a sztromelizin katalitikus helye (81-256 egység).



Egy helyspecifikus ^{13}C -dúsított protein fragmentum célmolekula előállítását az alábbiakban ismertetünk. A konkrét bemutatott példa a helyspecifikus ^{13}C -dúsított leucinnal, valinnal és izoleucinnal jelzett humán sztromelizin ("SCD") úgynevezett "katalitikus helyének" előállítását mutatja be. Bár az eljárást ^{13}C -jelzett aminosav prekursorokkal mutatjuk be, az eljárás ugyanígy végrehajtható ^{14}C -izotóppal jelzett aminosav prekursor kiindulási anyagok alkalmazásával. Előnyös eszköz a specifikusan ^{13}C -dúsított polipeptidet tartalmazó célmolekulák megfelelő mennyiségeinek előállítására a kívánt polipeptidet kódoló polinukleotidot tartalmazó expressziós vektorral rendelkező gazdasejt transzformáció. A proteint vagy polipeptid protein fragmentumot a transzformált sejtvonalnak olyan, a szakterületen ismert közegben való tenyésztésével expresszáljuk, amely a szén és a nitrogén beépíthető forrásait, és a találmány szerinti ^{13}C -dúsított biokémiai prekursorokat tartalmazza. A találmány szerinti protein vagy protein fragmentum helyspecifikus jelzésére egy célpolipeptid ^{13}C -jelzéséhez beépíthető források az aminosavak ^{13}C -jelzett bioszintetikus prekursorai.

Például ismeretes, hogy az α -keto-butirát az izoleucin bioszintézis-prekursora és hogy az α -keto-izovalerát mind a valin, mind a leucin bioszintézis-prekursora. Az alábbiakban ismertetett 1. reakcióvázlat bemutatja, hogyan állíthatók elő a specifikusan ^{13}C -dúsított leucin, izoleucin és valin bioszintézis-prekursorok. A reakcióvázlat szerinti eljárásban az ^{13}C -terminálisan-jelzett α -keto-vajsav és



α -keto-izovaleriánsav előállítására az izotóp-dúsítás forrásaként a viszonylag olcsó ^{13}C -dúsított metil-jodidot (H_3^{13}CI) alkalmazzák.

Egy egyenletesen ^{13}C -dúsított tápanyag, így például glükóz- $^{13}\text{C}_6$ használata tipikusan megfelelő, azonban ez igen költséges eszköz volt a ^{13}C -dúsítás a célmolekulába történő beépítésére. Továbbá, az egyenletesen ^{13}C -jelzett célmolekulákban a szénatom-helyek nagy többsége rendelkezik egy kovalens kötésű szomszédal, amely szintén ^{13}C -jelzett; ez ^{13}C - ^{13}C -kapcsolást eredményez, amely negatívan befolyásolhatja mind a jel-zaj arányt, mind a ^{13}C -jelzett helyek relaxációs tulajdonságait a cél-biomolekulában. Alternatív megoldásként a tápközeg tartalmazhat kereskedelmi forgalomban kapható, egyenletesen ^{13}C -jelzett aminosavakat. Míg ez az eljárás csökkenti a jelzés "hígítását", ez egy túlságosan költséges alternatíva, és hasonlóan rendelkezik a szomszédos szénatom ^{13}C - ^{13}C spin-spin kölcsönhatásai hátrányával.

Azonban a találmány szerinti eljárás egy polipeptid célmolekula ^{13}C -jelzésére a konkrét aminosavak ^{13}C -jelzett bioszintézis-prekursorait tartalmazó tápközegben a genetikailag módosított sejtvonal tenyésztését foglalja magában. A keletkező proteinben, protein fragmentumban vagy polipeptidben nemcsak bizonyos aminosavak izotóp-dúsítottak, de ezek az aminosavak helyspecifikusan jelzettek is.

A találmány egy kiviteli alakja szerinti eljárásban előnyös aminosav prekursorok a jelzett α -keto-vaajsav és az α -keto-izovaleriánsav. Ezen prekursorok bioszintézis ter-



mékei a leucin, az izoleucin és a valin, amelyekben konkrét oldallánc-metilcsoportok ^{13}C -dúsítottak. Mivel a metilcsoportok mindegyike három ^{13}C -jelzett szénatomhoz kapcsolódó hidrogénatommal rendelkezik, amikor n értéke 13, a megfelelő NMR-jelek különösen erősek és különállóak.

A jelzett α -keto-vajsav és α -keto-izovaleriánsav szintézise során a piroszőlősav terminális szénatomját ^{13}C -dúsított metil-jodiddal C-metilezzük. Általában az α -ketosavak, így például a piruvát alkilezése önmagában véve bonyolult, és az enolát intermedier bomlása kíséri számos melléktermék képződésével. Azonban Spencer és munkatársai a Tetrahedron Letters, 3889 (1976.) és Williams és munkatársai, a fenti szakirodalmi hely 5881. oldalán (1990.) bemutatták, hogy a megfelelő oxim enolát alkilezése végbement, bár a primer elektrofilek (például a metil-jodid) alkilezése problémás volt. D. Enders és munkatársai az Angew. Chem. Int. Ed., 618 (1992.) és D. Enders és munkatársai a Synlett, 901 (1992.) szakirodalmi helyen bemutatták, hogy a piruvát N,N-dimetil-hidrazonja alkilezése lehetséges, de konkrétan említették, hogy a terjedelmes 2,6-dialkil-fenil-észter szükséges volt az öncilezés megakadályozására. A találmány szerinti jellegzetes vegyületek a következők:

2-keto-4- (^{13}C) -vajsav vagy annak sója;

2-keto-4- (^{14}C) -vajsav vagy annak sója;

2-keto-3- $(^{13}\text{C}$ -metil)-4- (^{13}C) -vajsav vagy annak sója;

2-keto-3- $(^{14}\text{C}$ -metil)-4- (^{14}C) -vajsav vagy annak sója;

L-2-amino-3-metil-5- (^{13}C) -pentánsav vagy annak sója;

L-2-amino-3-metil-5-(¹⁴C)-pentánsav vagy annak sója;

L-2-amino-4-(¹³C-metil)-5-(¹³C)-pentánsav vagy annak sója;

L-2-amino-4-(¹⁴C-metil)-5-(¹⁴C)-pentánsav vagy annak sója;

L-2-amino-4-(¹³C-metil)-5-(¹³C)-butánsav vagy annak sója;

L-2-amino-4-(¹⁴C-metil)-5-(¹⁴C)-butánsav vagy annak sója.

A találmány a helyspecifikus izotóp-dúsított L-2-amino-3-metil-5-(¹³C)-pentánsav; L-2-amino-3-metil-5-(¹⁴C)-pentánsav; L-2-amino-4-(¹³C-metil)-5-(¹³C)-pentánsav, L-2-amino-4-(¹⁴C-metil)-5-(¹⁴C)-pentánsav, L-2-amino-3-(¹³C-metil)-5-(¹³C)-butánsav és L-2-amino-3-(¹⁴C-metil)-5-(¹⁴C)-butánsav aminosavakat tartalmazó proteinekre, protein fragmentumokra és polipeptidekre is vonatkozik.

Bár a fentebb megnevezett konkrét vegyületeknél jeleztük, hogy ¹³C- vagy ¹⁴C-izotópokat tartalmaznak a vegyületekben specifikus helyeken, a szakember számára érthető, hogy a vegyületekben ezeken a helyeken lévő szénatomok nem teljes mértékben ¹³C- vagy ¹⁴C-jelzettek. Minden molekula helyen az izotóp helyettesítés vagy "dúsítás" foka függ a szintézis során alkalmazott kiindulási anyagokban a megfelelő dúsítási foktól.

Az I. reakcióvázlatban a (1) terc-butil-piruvátot a megfelelő (2) N,N-dimetilhidrazonná alakítjuk annak dietil-éterben szobahőmérsékleten N,N-dimetil-hidrazinnal való reagáltatásával. A keletkező (2) hidrazont tetrahid-

rofurán oldatban $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre hűtjük és lítium-bromiddal, majd lítium-diizopropil-amiddal kezeljük, így az aza-allil-enolát intermediert kapjuk. Az enolátot ^{13}C -jelzett metil-jodiddal alkilezzük, így a (3) hidrazont kapjuk. A (3) vegyület alkilezésének második szakasza a (4) jelzett dimetilezett hidrazont eredményezi. A (3) és (4) vegyületek először vizes 1N HCl-val tetrahidrofuránban vagy dietil-éterben való kezelésével (a hidrazon eltávolítása érdekében), majd hidrogén-klorid gázzal metilén-kloridban való kezelésével (a terc-butil-észter eltávolítása érdekében) a megfelelő (5) és (6) ^{13}C -terminálisan jelzett α -ketosavakat eredményezik. A II., III. és IV. reakcióvázlatok sorrendben azt szemléltetik, hogyan történik ezeknek az α -ketosavaknak ^{13}C -leucinná, izoleucinná vagy valinná történő bioszintetikus átalakítása. A reakcióvázlatok mindegyikében az izotóp-dúsítás helye(i)t csillaggal jelöljük.

Olyan expresszázó vektorok előállítására, amelyek tartalmazzák a konkrét polipeptideket kódoló polinukleotid szekvenciákat, és ezekkel a vektorokkal a gazdasejtek átalakítására szolgáló eljárások a szakterületen ismertek (lásd: például R. W. Old és munkatársai: *Techniques of Gene Manipulation* (Gén manipulációs eljárások), Blackwell Science, London (1994.) és a szakterületen hasonló értekezéseket); hasonlóan eljárások transzformált sejtek tenyésztésére a kódolt polipeptid expresszázására és a polipeptid izolálására, tisztítására és annak térszerkezetének újbóli felvételére ("refolding") szintén ismertek a



szakterületen. Az alábbiakban ismertetett példák a humán sztromelizin (SCD) 81-256 aminosav katalitikus régiójának ^{13}C -dúsított mintái módosított E. coli általi előállítását ismertetik.

Példák

1. példa

Humán sztromelizin (SCD) egyenletesen ^{13}C -dúsított katalitikus helyének előállítása

A sztromelizin (SCD) 81-256-fragmentumát (szekvencia azonosítási szám: 1) a protein fragmentum előállítását egy E. coli törzsben kódoló plazmidnak a beillesztésével és egy megfelelő tenyészközegben a genetikailag módosított baktérium törzs tenyésztésével állítjuk elő. A protein fragmentumot a tenyészközegből izoláljuk, tisztítjuk, és annak a tesztvegyületekhez való affinitása szempontjából a két dimenziós NMR elemzésben a találmány szerinti eljárás szerint alkalmazzuk. Az előállítási eljárásokat az alábbiakban ismertetjük.

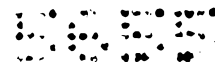
Humán bőr fibroblasztumokat (ATCC szám: CRL 15707) növesztünk és indukálunk a Clark és munkatársai által az Archiv. Biochem. and Biophys., **241**, 36 (1985.) szakirodalmi helyen ismertetett eljárással. 1 g sejtből a össz-RNS-t izoláljuk az RNAgents[®] Total RNA Isolation System Kit (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711, USA) alkalmazásával a gyártó utasításai szerint. Az RNS 1 μg részletét 80 °C hőmérsékleten 5 percig történő melegítéssel denaturáljuk, majd reverz transzkriptáz PCR-rel kezeljük egy GenAmp[®] RNA PCR készlet (Applied

Biosystems/Perkin-Elmer) alkalmazásával a gyártó utasításai szerint.

Az egymásba ágyazott PCR-t az (a) GAAATGAAGAGTCTTCAA (szekvencia azonosítási szám: 2) és (b) GCGTCCCAGGTTCTGGAG (szekvencia azonosítási szám: 3) első primerek és 94 °C hőmérséklet, 2 perc; 45 °C hőmérséklet, 2 perc; és 72 °C hőmérséklet, 3 perc 35 ciklus alkalmazásával hajtjuk végre. Ezt követi a (c) TACCATGGCCTATCCATTGGATGGAGC (szekvencia azonosítási szám: 4) és (d) ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGGAGTCAGG (szekvencia azonosítási szám: 5) belső primerekkel történő kiegészítés a közvetlenül fentebb ismertetettekkel azonos körülmények között, 30 ciklus alkalmazásával, a humán sztromelizin 1-256 aminosav egységére kódoló DNS szekvencia előállítására érdekében.

A PCR-fragmentumot a pT7Blue® (Novagen, Inc.) PCR klónozó vektorba klónozzuk a gyártó utasításai szerint. A keletkező plazmidot NcoI-vel és BamHI-vel vágjuk és a sztromelizin fragmentumot a pET3d (Novagen, Inc.) expresszázó vektorba al-klónozzuk - ismét a gyártó utasításai alkalmazásával.

A 81-256 aminosav egységekre kódoló érett sztromelizin expresszázó terméket és egy iniciáló metionin aminoacilmaradékot az 1-256 expresszázó termékből PCR-bővítés útján állítjuk elő. A keletkező PCR-fragmentumot először a pT7Blue® vektorba (Novagen, Inc.) klónozzuk, majd a pET3d vektorba (Novagen, Inc.) al-klónozzuk a fentebb ismertetett módon a gyártó utasításai alkalmazásával, így a pETST-83-256 plazmidot állítjuk elő. Ez a végső plazmid



azonos a Qi-Zhuang és munkatársai által a *Biochemistry*, 31, 11231 (1992.) szakirodalmi helyen ismertetett plazmiddal azzal az eltéréssel, hogy az itt ismertetett plazmid két aminosavval korábban, konkrétan a 81. pozícióban kezdődő peptid szekvenciát kódolja a humán sztromelizin szekvenciában. A pETST-83-256 plazmidot a BL21(DE3)/pLysS (Novagen, Inc.) *E. coli* törzsbe transzformáljuk a gyártó utasításai szerint, így a BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 expresszázó törzset állítjuk elő.

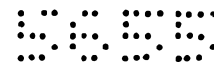
Az előtenyésztési közeget 1,698 g mennyiségű $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,45 g mennyiségű KH_2PO_4 , 0,075 g mennyiségű nátrium-klorid, 0,150 g mennyiségű NH_4Cl , 0,3 g mennyiségű U^{13}C -glükóz, 300 μl 1 M-os vizes MgSO_4 oldat és 15 ml vizes CaCl_2 -oldat 150 ml ionmentesített vízben történő feloldásával állítjuk elő. A keletkező előtenyésztési közeg-oldatot sterilizáljuk, és egy steril 500 ml-es rázó lombikba mérjük. Közvetlenül az előtenyésztési közegnek a baktérium törzsszel való beoltása előtt 34 mg/ml klóramfenikolt 100 % etanolban tartalmazó 150 ml oldatot és 20 mg/ml ampicillint tartalmazó 1,5 ml oldatot a lombik tartalmához adunk. A lombik tartalmát ezután 1 ml BL21(DE3)/pLysS/pTST-255-1 genetikailag módosított *E. coli* törzs 1 ml glicerines törzsoldatával beoltjuk. A lombik tartalmát 37 °C hőmérsékleten rázzuk (225 fordulat/perc), amíg 0,65 optikai sűrűséget mérünk.

Fermentációs tápközeget állítunk elő 113,28 g mennyiségű $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 g mennyiségű KH_2PO_4 , 5 g mennyiségű



nátrium-klorid és 10 ml 1 %-os DF-60 habzásgátló sz
ml ionmentesített vízben történő feloldásával. Ezt a
datot egy New Brunswick Scientific Micros Fermenter (Lai-
son, NJ) típusú készülékbe helyezzük, és 125 °C hőmérsék-
leten 40 percig sterilizáljuk. Közvetlenül a fermentációs
közeg beoltása előtt a következő elősterilizált összetevő-
ket adjuk a fermentációs edény tartalmához: 100 ml 10 %-os
vizes NH_4Cl -oldat, 15 g mennyiségű egyenletesen ^{13}C -
-dúsított glükóz, 20 ml vizes 1M-os MgSO_4 -oldat, 1 ml vi-
zes 1M-os CaCl_2 -oldat, 5 ml (10 g/ml) vizes tiamin-hidro-
klorid oldat, 10 ml (34 mg/ml) klóramfenikolt 100 %-os
etanolban tartalmazó oldat és 1,9 g mennyiségű, a klór-
amfenikol oldatban feloldott ampicillin. A keletkező oldat
kémhatását 4N H_2SO_4 vizes oldat hozzáadásával pH = 7,00-ra
állítjuk.

A BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 *E. coli* törzs
előtenyészetét a fent ismertetett rázólabdik méretnövelési
eljárásból a fermentor tartalmához adjuk, és a sejtnöveke-
dési folyamatot addig engedjük végbemenni, amíg 0,48 érté-
kű optikai sűrűséget érünk el. A folyamat alatt a fermen-
tor tartalmának kémhatását - szükség szerint 4N H_2SO_4 vagy
4N KOH hozzáadásával - automatikusan pH=7,0 értéken tart-
juk. A fermentor tartalmának feloldódott oxigén mennyisé-
gét egy kaszkád hurok segítségével 55 % levegő telítettség
felett tartjuk, amely növeli a keverési sebességet, amikor
a feloldódott oxigén tartalma 55 % alá csökken. A levegőt
a fermentor tartalmához 7 standard liter/perc (SLPM) áram-



lási sebességgel adagoljuk, és a tenyészet hőmérsékletét az eljárás folyamán végig 37 °C-on tartjuk.

A sejteket 10 percig 4 °C hőmérsékleten 17 000 g mellett végrehajtott centrifugálással kitermeljük, és a keletkező sejt pelleteket összegyűjtjük és -85 °C hőmérsékleten tároljuk. A nedves sejt hozama 3,5 g/liter. A sejt lizátok oldékony és oldhatatlan frakciói nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) elemzése alapján megállapítható, hogy a sztromelizin körülbelül 50 %-a az oldékony fázisban volt.

A fentiek szerint előállított sztromelizin fragmentumot a Ye és munkatársai által a *Biochemistry*, 31, 11231 (1992.) szakirodalmi helyen ismertetett eljárás módosításának alkalmazásával tisztítjuk. A kitermelt sejteket 20 mM Trisz-HCl puffer (pH=8,0), 1 mM MgCl₂-ot tartalmazó nátrium-azid oldat, 0,5 mM ZnCl₂, 25 egység/ml Benzonase[®] enzim (Benzon Pharma A/S Roskilde, Dánia) és 4-(2-aminoetil)-benzolszulfonil-fluoridból ("AEBSF"), Leupeptin[®]-ből, Aprotinin[®]-ből és Pepstatin[®]-ből (mindegyikük koncentrációja 1 mg/ml) álló inhibitor elegy keverékében szuszpendáljuk. (Az AEBSF, a Leupeptin[®], az Aprotinin[®] és a Pepstatin[®] márkanevű termékek az American International Chemical vállalattól kaphatók.) A keletkező elegyet 1 óráig kíméletesen keverjük, majd 4 °C hőmérsékletre hűtjük. A sejteket azután ultrahang-kezeléssel 50 %-os teljesítmény ciklus alkalmazásával elválasztjuk. A keletkező lizátot 14 000 fordulat/perc mellett 30 percig



centrifugáljuk és az oldhatatlan frakció pelletjét $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten fagyasztjuk az ezt követő feldolgozáshoz.

A felülúszóhoz szilárd ammónium-szulfátot adunk a 20 %-os telítési pontig, és a keletkező oldatot 700 ml-es fenil-Sepharose gyors áramlású ("Q-Sepharose FF" márkanevű) oszlopra (Pharmacia Biotech.) töltjük. A feltöltés előtt a Sepharose oszlopot 50 mM-os trisz-HCl pufferrel (pH=7,6, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten), 5 mM-os CaCl_2 -dal és 1M-os $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal egyensúlyba hozzuk. A feltöltött oszlopot vizes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ csökkenő koncentrációi (1M-ról 0M-ra) és a vizes CaCl_2 növekvő koncentrációi (5 mM-ról 20 mM-ra) által a trisz-HCl pufferben pH = 7,6 kémhatás mellett képzett lineáris gradienssel eluáljuk. Az eluátum aktív frakcióit összegyűjtjük és egy Amicon kevert cellában (Amicon Inc.) koncentrálnak. A koncentrált mintát egy éjszakán át dializáljuk a Q-Sepharose FF oszloppal alkalmazott, 10 mM-os CaCl_2 -dal kiegészített 50 mM-os trisz-HCl (pH=8,2, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten) kiindulási pufferben.

A dializált mintát a Q-Sepharose FF oszlopra töltjük, és a kiindulási puffert és 200 nM-os NaCl-ot tartalmazó lineáris gradienssel eluáljuk. A sztromelizin fragmentum tisztított oldható frakcióját koncentrálnak és $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároljuk. A pelletet 8M-os guanidin-HCl-ban oldhatóvá tesszük. Az oldatot 20 percig 20 000 fordulat/perc mellett centrifugáljuk és a felülúszót cseppenként az 50 mM-os trisz-HCl-ot (pH=7,6), 10 mM-os CaCl_2 -ot, 0,5 mM-os ZnCl_2 -ot és az AEBSF, a Leupeptin[®], az Aprotinin[®] és a Pepstatin[®] (mindegyikük koncentrációja 1 $\mu\text{g/ml}$) inhibitor



elegyet tartalmazó, a térszerkezet felvételét elősegítő pufferhez adjuk. A térszerkezet felvételét elősegítő puffer térfogata a felülúszó térfogatának 10-szerese. A felülúszó és a térszerkezet felvételét elősegítő puffer elegyét 20 000 fordulat/perc mellett 30 percig centrifugáljuk. Az ebből a centrifugálásból származó felülúszót 4 °C hőmérsékleten tároljuk, és a pelletet a fentebb bemutatott guanidin-HCl-ban való oldhatóvá tételig, pufferben térszerkezet újbóli felvételi és centrifugálási lépésekkel kétszer kezeljük. A végső felülúszókat mind a három centrifugálásból egyesítjük, és szilárd ammónium-szulfátot adunk hozzá a 20 %-os telítési pontig. Az oldhatatlan frakcióból így keletkező oldatot a fentiekben az oldható frakcióra ismertetett módon fenil-Sepharose-on és Q-Sepharose-on tisztítjuk. A tisztított oldékony és oldhatatlan frakciókat egyesítjük, így az eredeti sejt paszta 1 grammjára számítva körülbelül 1,8 mg tisztított, ¹³C-izotóppal egyenletesen dúsított sztromelizin 81-256 fragmentumot (SCD) kapunk.

2. példa

A humán sztromelizin (SCD) specifikusan ¹³C-izotóppal dúsított katalitikus helyének előállítása

Az SCD-t a BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 módosított *E. coli* törzs 2-keto-4-(¹³C)-vajsvavat, vagy annak sóját és 2-keto-3-(¹³C)-metil-4-(¹³C)-vajsvavat vagy annak sóját tartalmazó közegben történő tenyésztésével expresszáljuk. A genetikailag tervezett *E. coli* törzs előállítására és a protein fragmentum expresszálására, izolálására és tisztí-

tására alkalmazott eljárások megegyeznek a fentiekben ismerttetettekkel azzal az eltéréssel, hogy U-¹²C-glükózt alkalmazunk U-¹³C-glükóz helyett.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy a bemutatott kiviteli alakokban számos módosítás hajtható végre anélkül, hogy a találmány tárgyától az eltérést jelentene.



Szekvencialista

- <110> Abbott Laboratories
Augeri, David J.
Fesik, Stephen F.
- <120> Helyspecifikus izotóp-jelzéssel ellátott, protei-
nek,
aminosavak és biokémiai prekursorok azokhoz
- <130> 6470.US.01
- <140> 289 517 számú amerikai egyesült államokbeli
szabadalmi leírás
- <141> 1999. április 9.
- <160> FastSEQ for Windows Version 3.0
- <210> 1
- <211> 174
- <212> PRT
- <213> Mesterséges szekvencia
- <220>
- <223> A humán sztromelizin 81-256 katalitikus régiója
- <400> 1

```

Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr His Leu Thr
 1                    5                    10                    15
Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu Pro Lys Asp Ala Val Asp
 20                    25                    30
Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu Lys Val Trp Glu Glu Val Thr Pro Leu
 35                    40                    45
Thr Phe Ser Arg Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Ser Phe
 50                    55                    60
Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Asn
 65                    70                    75                    80
Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro Gly Ile Asn Gly Asp Ala
 85                    90
His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly Thr Asn
 100                    105                    110
Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Phe
 115                    120                    125
His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Leu Tyr His Ser Leu
 130                    135                    140
Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn Gly Ile
 145                    150                    155                    160
Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
 165                    170

```

- <210> 2
- <211> 18
- <212> DNS
- <213> Mesterséges szekvencia



<220>
<223> Primer

<400> 2
gaatgaaga gtcttcaa

<210> 3
<211> 18
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> Primer

<400> 3
gcgctccagg ttctggag

<210> 4
<211> 27
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> Primer

<400> 4
taccatggcc tatccattgg atggagc

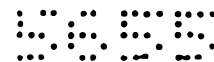
<210> 5
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> Primer

<400> 5
ataggatcct taggtctcag gggagtcagg

Szabadalmi igénypontok

1. A (I/I) általános képletű vegyület vagy annak sója - a képletben
- R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom vagy NH_2 -csoport;
- R^2 helyettesítő jelentése (I/1.a) képletű csoport vagy (I/2.a) képletű csoport, ahol
- R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy nCH_3 -csoport;
- a pontozott vonallal jelzett kötés egy második vegyértékkötést jelent;
- m értéke 0 vagy 1; és
- n értéke minden előfordulásakor 13 vagy 14;
- azokkal a feltételekkel, hogy
- i) amikor R^1 helyettesítő jelentése NH_2 -csoport, akkor a pontozott vonallal reprezentált, R^1 helyettesítőhöz kapcsolódó második vegyértékkötés hiányzik, és a pontozott vonallal reprezentált kötéshez kapcsolódó hidrogénatom jelen van;
 - ii) amikor R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom, akkor a pontozott vonallal reprezentált R^1 helyettesítőhöz kapcsolódó második vegyértékkötés jelen van, és a pontozott vonallal reprezentált kötéshez kapcsolódó hidrogénatom hiányzik;
 - iii) amikor R^1 helyettesítő jelentése oxigénatom, R^2 jelentése B és m értéke 0; és
 - iv) amikor R^1 helyettesítő jelentése NH_2 csoport, R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy nCH_3 -csoport.



2. Az 1. igénypont szerinti vegyületből - a képletben R^1 helyettesítő jelentése $-NH_2$ -csoport - származó aminos-
acil-maradékot tartalmazó protein, protein fragmentum vagy
polipeptid.

3. Az (Ia) általános képletű vegyület vagy annak só-
ja - a képletben R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom
vagy nCH_3 -csoport és n értéke annak minden előfordulásakor
13 vagy 14.

4. A 3. igénypont szerinti, az alábbi vegyületek közül
kiválasztott vegyület:

2-keto-4- (^{13}C) -vajsav;

2-keto-3- $(^{13}C$ -metil)-4- (^{13}C) -vajsav;

2-keto-4- (^{14}C) -vajsav; és

2-keto-3- $(^{14}C$ -metil)-4- (^{14}C) -vajsav;

vagy annak sója.

5. Az (Ib) általános képletű vegyület - a képletben
 R^2 helyettesítő jelentése (I/1.a) általános képletű cso-
port vagy (I/2.a) általános képletű csoport, ahol
 R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy nCH_3 -cso-
port;

m értéke 0 vagy 1 és

n értéke annak minden előfordulásakor 13 vagy 14.

6. Az 5. igénypont szerinti, az alábbi vegyületek kö-
zül kiválasztott vegyület:

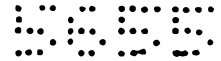
L-2-amino-3-metil-5- (^{13}C) -pentánsav;

L-2-amino-3-metil-5- (^{14}C) -pentánsav;

L-2-amino-3- $(^{13}C$ -metil)-5- (^{13}C) -butánsav;

L-2-amino-3- $(^{14}C$ -metil)-5- (^{14}C) -butánsav;

L-2-amino-3- $(^{13}C$ -metil)-5- (^{13}C) -pentánsav; és



L-2-amino-3-(^{14}C -metil)-5-(^{14}C)-pentánsav;
vagy annak sója.

7. Egy vagy több aminoacil maradékot tartalmazó prote-
in, protein fragmentum vagy polipeptid, amelyben a szóban
forgó egy vagy több aminoacil maradék a (IIb) általános
képletű vegyület - a képletben

R^2 helyettesítő jelentése az (I/1.a) általános képletű
csoport vagy az (I/2.a) általános képletű csoport,
ahol

R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy $^n\text{CH}_3$ -cso-
port;

m értéke 0 vagy 1 és

n értéke annak minden előfordulásakor 13 vagy 14.

8. Eljárás az (Ia) általános képletű vegyület vagy an-
nak sója - a képletben

R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy $^n\text{CH}_3$ -csoport;
és

n értéke annak minden előfordulásakor 13 vagy 14 -

előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő
lépéseket hajtjuk végre:

a) a (IV) általános képletű vegyületet izotóp-jelzett
metil-jodiddal (H_3^nCI) reagáltatjuk, így az (V) általános
képletű vegyületet állítjuk elő, és

b) a terc-butil-észter és a dimetil-hidrazin-cso-
portokat eltávolítjuk, így 2-keto-4-(^nC)-vajsavat állítunk
elő.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jelle-
mezve, hogy a b) lépés szerint reakciótermékből sót is
képzünk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemelve, hogy

c) a b) lépésből származó terméket izotóp-jelzett metil-jodiddal ($H_3^{14}CI$) - a képletben n értéke 13 vagy 14 - reagáltatjuk, így a (VI) általános képletű vegyületet kapjuk, és

d) a terc-butil-észter- és dimetilhidrazin-csoportokat eltávolítjuk, így 2-keto-3- (^{14}C) -metil-4- (^{14}C) -vajsavat kapunk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemelve, hogy a d) lépésből származó termékből só is képzünk.

12. Eljárás legalább egy 4- (^{14}C) -metil-5- (^{14}C) -leucil-, 5- (^{14}C) -izoleucil-, vagy 3- (^{14}C) -metil-4- (^{14}C) -valil-aminoacil maradékot tartalmazó protein, protein fragmentum vagy polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy megfelelő mikroorganizmust genetikailag módosítunk az említett protein, protein fragmentum vagy polipeptid expresszálására;

b) a genetikailag módosított mikroorganizmust az (Ia) általános képletű vegyületet vagy annak sóját - a képletben n értéke annak minden egyes előfordulásakor 13 vagy 14 és R^3 helyettesítő jelentése hidrogénatom vagy $^{14}CH_3$ -csoport - tartalmazó tápközegben tenyésztjük, és

c) az említett proteint, protein fragmentumot vagy polipeptidet izoláljuk.

13. Eljárás legalább egy 3-metil-5- (^{14}C) -izoleucil-aminoacil maradékot tartalmazó protein, protein fragmentum

vagy polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy megfelelő mikroorganizmust genetikailag módosítunk az említett protein, protein fragmentum vagy polipeptid expresszáására;

b) az említett genetikailag módosított mikroorganizmust egy az (Ia'') általános képletű vegyületet vagy annak sóját - a képletben n értéke annak minden előfordulásakor 13 vagy 14 - tartalmazó tápközegben tenyésztjük, és

c) az említett proteint, protein fragmentumot vagy polipeptidet izoláljuk.

14. Eljárás 2-amino-3-(¹⁴C)-metil-4-(¹⁴C)-vajsav előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy megfelelő mikroorganizmust genetikailag módosítunk a valin egy homopolimerjének expresszáására;

b) az említett genetikailag módosított mikroorganizmust egy az (Ia') általános képletű vegyületet vagy annak sóját - a képletben n értéke annak minden egyes előfordulásakor 13 vagy 14 - tartalmazó tápközegben tenyésztjük;

c) az említett genetikailag módosított mikroorganizmusok által expresszált valin homopolimert izoláljuk; és

d) az említett homopolimert fragmentáljuk, így 2-amino-3-(¹⁴C)-metil-4-(¹⁴C)-vajsavat állítunk elő.

15. Eljárás 2-amino-4-(¹⁴C)-metil-5-(¹⁴C)-pentánsav előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy megfelelő mikroorganizmust genetikailag módosítunk a leucin egy homopolimerjének expresszáására;

b) az említett genetikailag módosított mikroorganizmust egy az (Ia') általános képletű vegyületet vagy annak

sóját - a képletben n értéke annak minden előfordulásakor 13 vagy 14 - tartalmazó tápközegben tenyésztjük,

c) az említett genetikailag módosított mikroorganizmus által expresszált leucin homopolimert izoláljuk, és

d) az említett homopolimert fragmentáljuk, így 2-amino-4-(¹⁴C)-metil-5-(¹⁴C)-pentánsavat állítunk elő.

16. Eljárás 2-amino-3-metil-5-(¹⁴C)-pentánsav előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy megfelelő mikroorganizmust genetikailag módosítunk az izoleucin egy homopolimerjének expresszáálására,

b) a genetikailag módosított mikroorganizmust egy az (Ia") általános képletű vegyületet vagy annak sóját - a képletben n értéke annak minden előfordulásakor 13 vagy 14 - tartalmazó tápközegben tenyésztjük,

c) az említett genetikailag módosított mikroorganizmus által expresszált izoleucin homopolimert izoláljuk, és

d) az említett homopolimert fragmentáljuk, így 2-amino-3-metil-5-(¹⁴C)-pentánsavat állítunk elő.

A meghatalmazott:

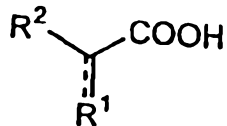
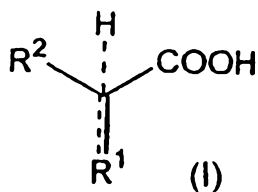
Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

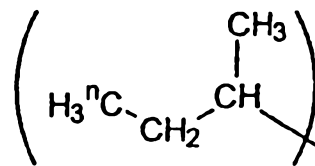

dr. Molnár István

szabadalmi ügyvivőjelölt

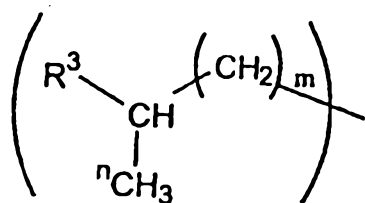
30. oldal
István István
35. oldal
István



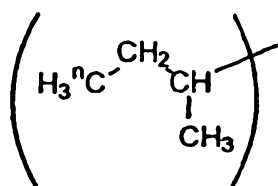
(I/I)



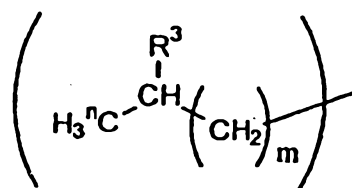
(I/1)



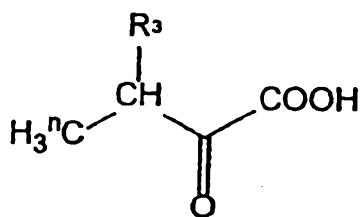
(I/2)



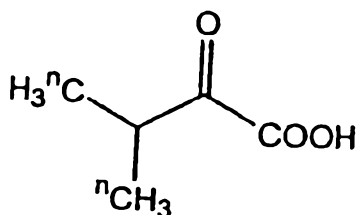
(I/1.a)



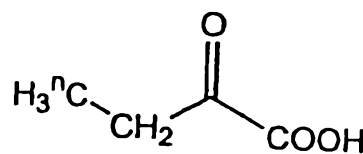
(I/2.a)



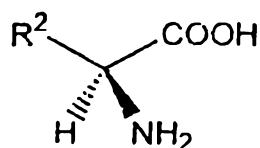
(Ia)



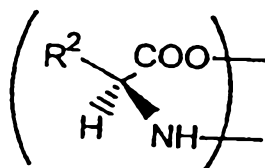
(Ia')



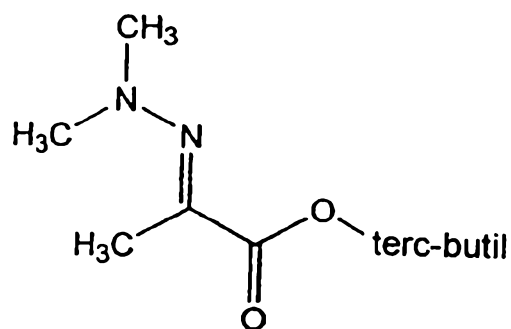
(Ia'')



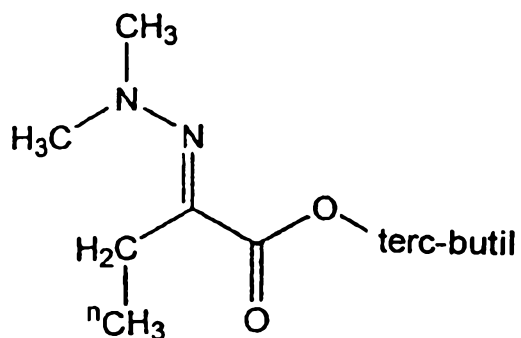
(Ib)



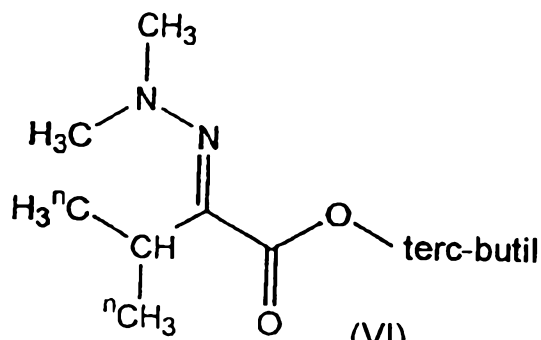
(IIb)



(IV)



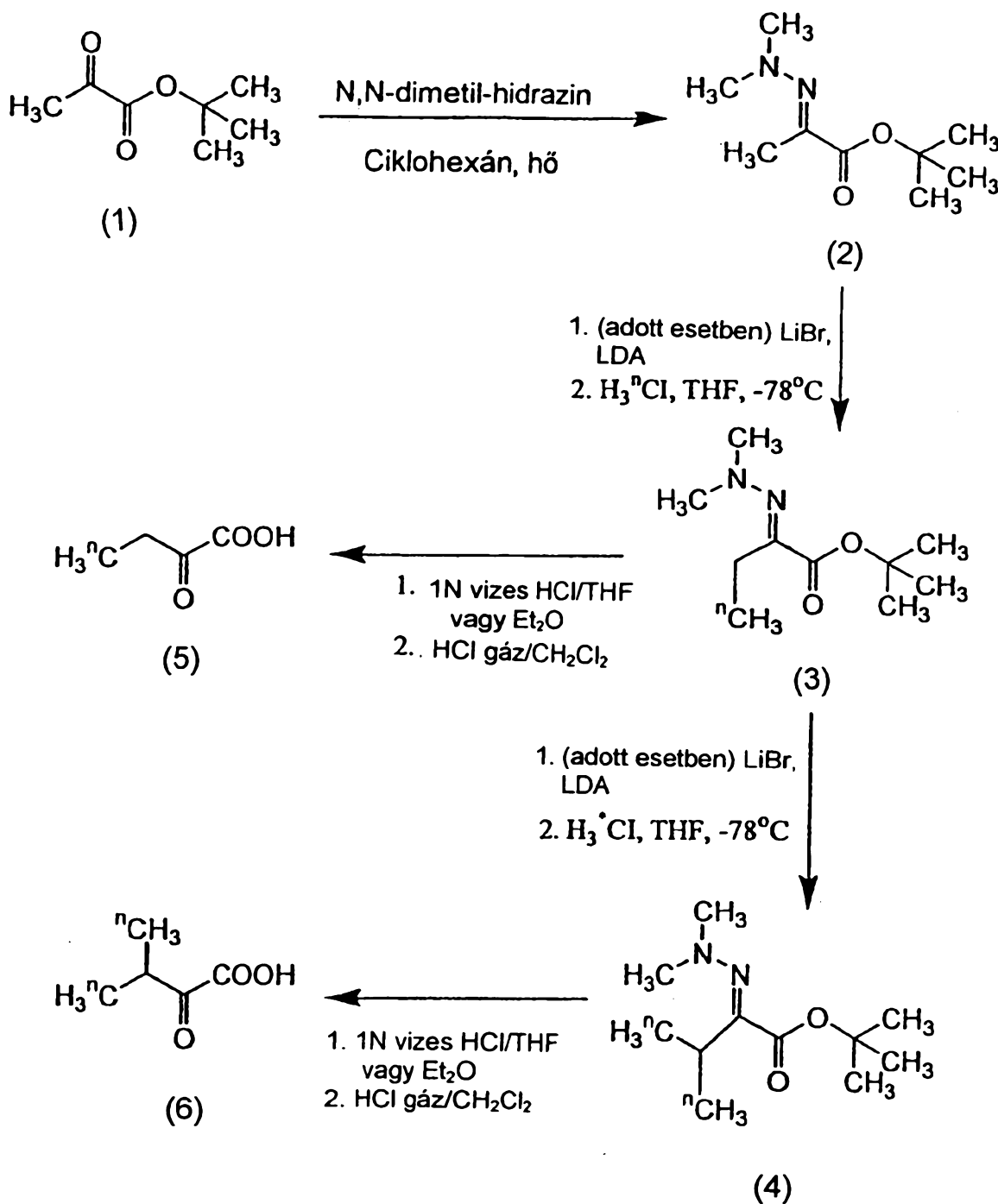
(V)



(VI)

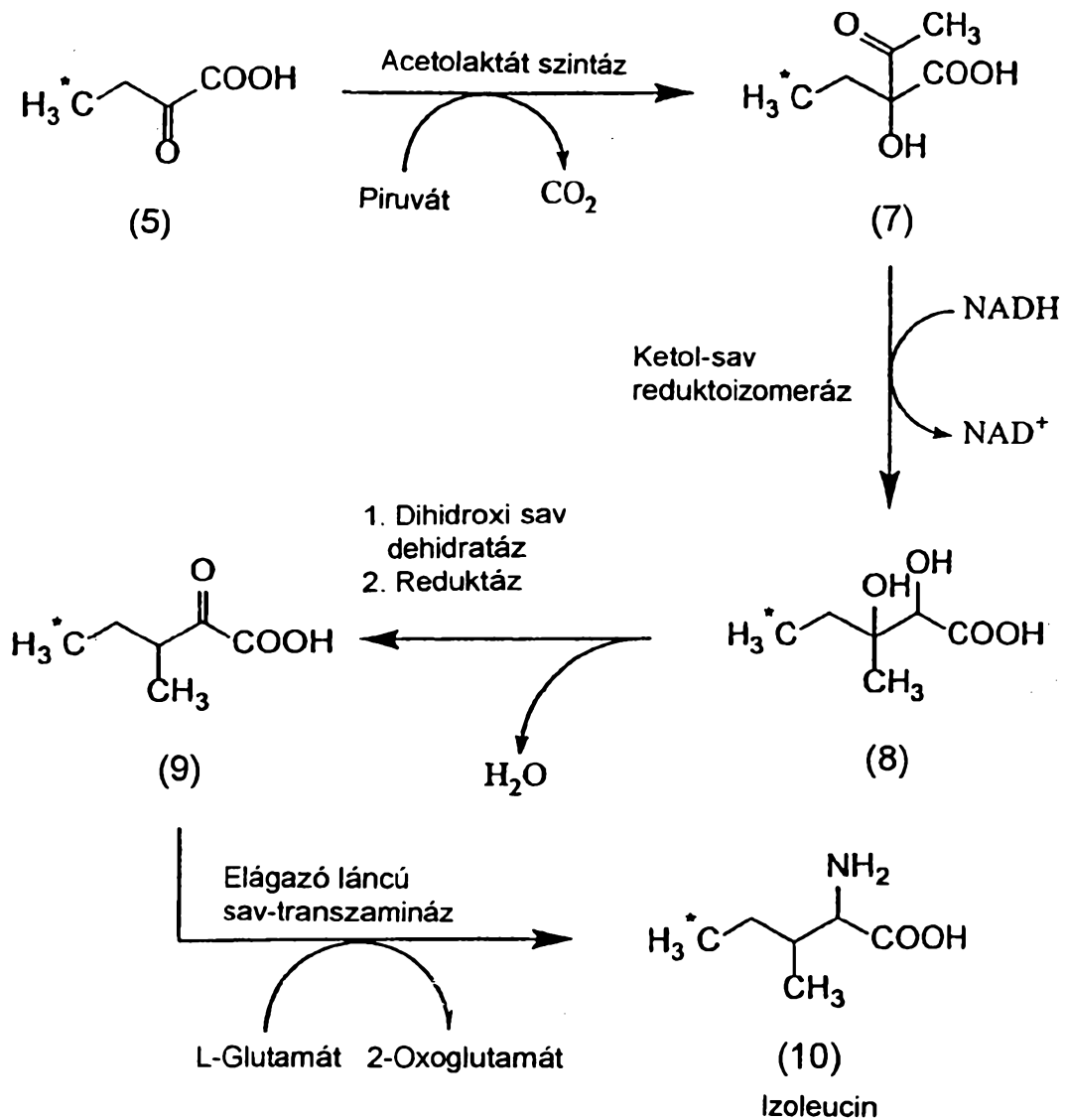
1. reakcióvázlat

Jelzett prekursorok kémiai szintézise



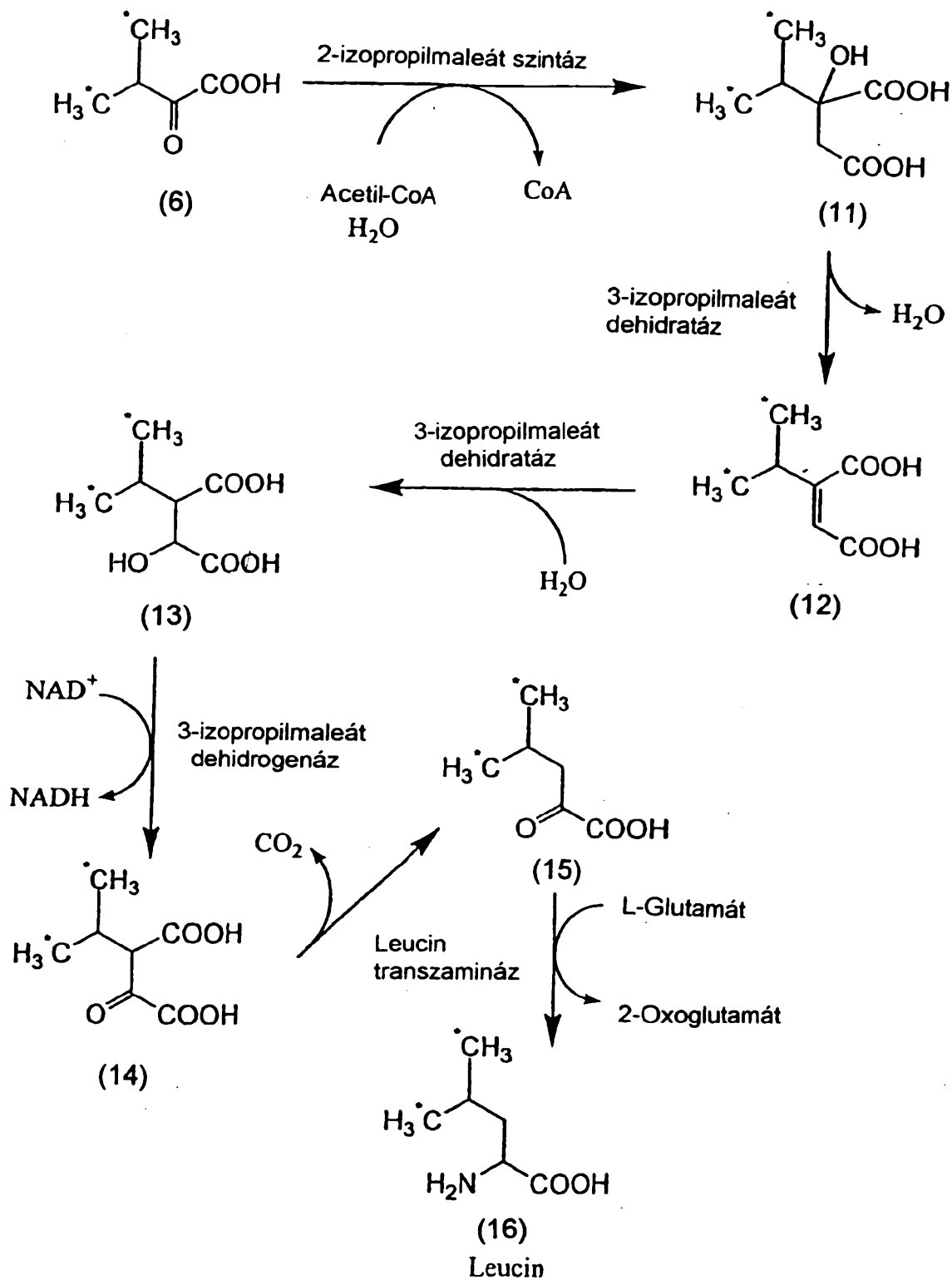
2. reakcióvázlat

Jelzett izoleucin biokémiai szintézise



3. reakcióvázlat

Jelzett leucin biokémiai szintézise



4. reakcióvázlat

Valin biokémiai szintézise

