



MD 4384 C1 2016.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4384** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2013 0099 (22) Data depozit: 2012.05.21</p> <p>(31) Nr.: 11167761.3 (32) Data: 2011.05.26 (33) Țara: EP</p> <p>(41) Data publicării cererii: 2014.06.30</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.11.30, BOPI nr. 11/2015</p> <p>(85) 2013.12.23 (86) PCT/EP2012/059373, 2012.05.21 (87) WO 2012/160027 A1, 2012.11.29</p>
<p>(71) Solicitant: RICHTER-HELM BIOTEC GMBH & CO. KG, DE (72) Inventatori: SCHILLING Ralf, DE; DIEDERICH Bettina, DE (73) Titular: RICHTER-HELM BIOTEC GMBH & CO. KG, DE (74) Mandatar autorizat: CRASNOVA Nadejda</p>	

(54) Celulă gazdă și procedeu de expresie recombinantă a interferonului solubil

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la o celulă gazdă și la un procedeu de expresie recombinantă a interferonului solubil.

Conform invenției, se revendică o celulă gazdă pentru expresia recombinantă a unei proteine de interferon provenite de la mamifere, unde celula menționată cuprinde: (a) o genă endogenă funcțională *trxB* și (b) o genă

2
endogenă inactivată *gor*, de asemenea invenția se referă la utilizarea celulelor gazdă pentru expresia recombinantă a unei proteine de interferon și la un procedeu de expresie recombinantă a unui interferon solubil într-o celulă gazdă.

Revendicări: 14

Figuri: 4

MD 4384 C1 2016.06.30

(54) Host cell and method for the recombinant expression of a soluble interferon**(57) Abstract:**

1
The invention relates to biotechnology, particularly to a host cell and a method for the recombinant expression of a soluble interferon.

According to the invention, a host cell for recombinant expression of a mammalian interferon protein is claimed, said cell comprising: (a) a functional endogenous *trxB* gene and (b) an inactivated endogenous *gor*

2
gene, the invention further relates to the use of such host cells for the recombinant expression of an interferon protein and to a method for the recombinant expression of a soluble interferon in a host cell.

Claims: 14

Fig.: 4

(54) Клетка-хозяин и способ рекомбинантной экспрессии растворимого интерферона**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к биотехнологии, в частности к клетке-хозяин и к способу рекомбинантной экспрессии растворимого интерферона.

Согласно изобретению, заявляют клетку-хозяин для рекомбинантной экспрессии белка интерферона млекопитающих, причём упомянутая клетка включает: (a) функциональный эндогенный *trxB* ген и (b)

2
инактивированный эндогенный *gor* ген, также изобретение относится к использованию клеток-хозяев для рекомбинантной экспрессии белка интерферона и к способу рекомбинантной экспрессии растворимого интерферона в клетке-хозяине.

П. формулы: 14

Фиг.: 4

Descriere:

Prezenta invenție se referă la biotehnologie, în special la o celulă și la un procedeu de expresie recombinantă a interferonului solubil.

5 Interferonii reprezintă o grupă de glicoproteine secretate de către celulele de mamifere ca răspuns la diverși stimuli, cum ar fi infecția virală sau bacteriană. Interferonii posedă diverse caracteristici terapeutice utile, cum ar fi imunostimulatoare, antiproliferative și activități antivirale. În mod corespunzător, aceste proteine se aplică pe larg în tratamentul numeroaselor boli și tulburări, inclusiv a infecțiilor virale și a unor forme de cancer, cum ar fi mielomul multiplu, leucemia, carcinomul renal și altele. După originea lor celulară și antigenicitate, interferonii umani se clasifică în trei grupe. La ființele umane, interferonii alfa sunt produși de leucocite, interferonii beta de fibroblaste și interferonii gamma de celulele B.

Inițial interferonii erau obținuți prin purificarea proteinelor din surse naturale, de ex. din leucocite și fibroblaste ale sângelui. Apariția tehnologiei ADN-ului recombinant a făcut posibilă producerea interferonilor și la scară industrială, de ex. prin expresia recombinantă a proteinelor de interferon în celulele gazdă bacteriene. *Escherichia coli* este unul dintre cele mai des folosite organisme gazdă bacteriene pentru expresia recombinantă a proteinelor heterologe datorită capacității de creștere rapidă până la densități mari ale celulelor, disponibilității unui număr vast de vectori de clonare și ușurinței de introducere a unor asemenea vectori în celule pentru expresia ulterioară. Majoritatea interferonilor care sunt disponibili astăzi pentru utilizarea în medicina umană au fost produși în sistemele de expresie *E. coli*. Pe de altă parte, după cum se cunoaște, expresia proteinelor heterologe în *E. coli* este asociată cu anumite limitări, fapt ce creează probleme pentru producerea cantităților mari de proteine farmaceutic active. O problemă des întâlnită în sistemele de expresie *E. coli* reprezintă incapacitatea celulei gazdă de a produce cantități considerabile de proteine recombinante în formă solubilă și activă. În schimb, cea mai mare parte a proteinei este păstrată în formă de corpusculi de incluziune, adică în agregatele proteinelor denaturate. Cauza principală a incapacității de creare a proteinelor recombinante solubile constă în faptul că citoplasma *E. coli* reprezintă un mediu reducător, care împiedică formarea legăturilor disulfurice. Pentru separarea proteinei active din corpusculii de incluziune este nevoie de replierea proteinelor cu ajutorul agenților reducători, cum ar fi ditiotreititolul și β -mercaptoetanolul, sau agenților de denaturare, cum ar fi guanidina-HCl și ureea, care adesea este ineficientă și asociată cu pierderi inacceptabile ale produsului.

Pentru depășirea acestor neajunsuri au fost elaborate celule gazdă, în care anumite gene reductaze au fost inactivate pentru a crea un mediu mai oxidativ care să permită formarea legăturilor disulfurice. Aceste celule gazdă modificate au mutații în gene care codifică reductaza tioredoxin (*trxB*) și oxidoreductaza glutation (*gor*). Prin intermediul acestor mutații, devine posibilă formarea legăturilor disulfurice în citoplasmă și este sporit randamentul produsului solubil. Celulele gazdă cu o deficiență în genele *trxB* și *gor* sunt disponibile, de ex., sub denumirile comerciale Origami™ (Novagen) sau SHuffle™ (NEB). S-a demonstrat că celulele *trxB*/*gor* Origami™ B (DE3) (numite în continuare Origami (DE3); Novagen) pot fi folosite cu succes pentru expresia interferonului recombinant $\alpha 2b$ după cum este descris în cererea publicată SUA 2009/0258394.

În ciuda acestor îmbunătățiri, totuși există necesitatea de sisteme de expresie mai eficiente, care ar putea fi utilizate pentru producerea sigură a proteinelor de interferoni, îndeosebi a proteinelor de interferoni umani. Sistemele noi de expresie trebuie să permită producerea cantităților mari de proteine de interferoni solubili, în același timp reducând la minimum porțiunea de proteină denaturată. În mod ideal, sistemele de expresie ar trebui să fie ușor de manipulat și să permită producerea citokinelor, cum ar fi interferonii, la prețuri reduse.

Prezenta invenție propune celule gazdă noi care sunt în special potrivite pentru expresia recombinantă a proteinelor de interferon provenite de la mamifere. S-a stabilit că celulele gazdă îmbunătățite pentru expresia proteinelor de interferon pot fi obținute prin inactivarea genei endogene *gor* a celulei gazdă și menținerea simultană a genei endogene funcționale *trxB*. În mod neașteptat, menținerea unei gene endogene funcționale *trxB* în celula gazdă a dus la randamente sporite semnificativ ale proteinelor recombinante de interferon. Se poate presupune că produsul genă *trxB* participă în diferite căi regulate, care au un impact asupra randamentului produsului de expresie.

Prin utilizarea celulelor gazdă noi pentru producerea recombinantă a interferonului se obțin cantități mari de proteine solubile fără formarea substanțială a corpusculilor de incluziune. După cum este indicat în exemplele de mai jos, celulele gazdă din invenție produc cantități semnificativ mai mari de interferon solubil decât celulele corespunzătoare care au mutații în genele *gor* și *trxB*. Astfel, celulele gazdă noi reprezintă o îmbunătățire semnificativă a nivelului cunoscut al tehnicii, deoarece ele simplifică producerea proteinelor de interferon și reduc în același timp cheltuielile de producere.

5
10
15
Intr-un prim aspect, prezenta invenție se referă astfel la o celulă gazdă care este potrivită pentru expresia recombinantă a proteinei de interferon, unde celula gazdă menționată cuprinde (a) o genă endogenă funcțională *trxB* și (b) o genă endogenă inactivată *gor*. Expresia recombinantă semnifică faptul că expresia proteinei dorite este efectuată de un acid nucleic obținut prin metoda ingineriei genetice. De preferință, o celulă gazdă prevăzută cu un vector de expresie ce include o succesiune de polinucleotide, care codifică o proteină de interferon este cultivată în condiții potrivite pentru expresia interferonului. Invenția se mai referă la utilizarea unor asemenea celule gazdă pentru expresia recombinantă a unei proteine de interferon.

20
25
Conform invenției, poate fi utilizată orice celulă care este cunoscută în domeniul dat ca fiind potrivită în calitate de gazdă pentru expresia proteinelor heterologe și care a fost modificată prin inactivarea genei endogene *gor*. Celula poate fi de origine eucariotă sau procariotă. Intr-o variantă de executare, celula gazdă este o celulă de mamifere, de ex., o celulă primară sau o linie de celule obținută de la un șoarece, șobolan, hamster, câine sau primat, altul decât cel uman. Celulele de mamifere care s-au dovedit a fi utile pentru expresia heterologă a proteinelor includ celule primare (de ex. celule din măduva osoasă a șoarecilor, celule stem hematopoietice, limfocite de șoareci, celule de mușchi, hepatocite și altele) și linii de celule stabilite (de ex. celule de ovar de hamster chinezesc (CHO), celule de rinichi de maimuță (COS), celule de rinichi de pui de hamster (BHK), celule de rinichi de maimuță africană verde (Vero), celule de rinichi canin Madin Darby (DCK) și altele).

30
35
Intr-o variantă ulterioară de executare, celula gazdă din invenție este o celulă de drojdie. De ex., celulele de drojdie, care au fost obținute din speciile *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* și *Pichia pastoris*, s-au dovedit a fi utile pentru expresia proteinelor de interferon (Skoko ș.a., (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38 (Pt3) : 257-65). Intr-o altă variantă de executare, celula gazdă conform invenției poate fi obținută, de asemenea, din celule de insecte, cum ar fi din celulele speciilor de insecte *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda* sau *Trichoplusia ni*.

40
În prezenta invenție se preferă în special utilizarea celulelor gazdă bacteriene în vederea ușurinței manipulării și creșterii rapide a celulelor. Celulele bacteriene de la numeroase specii sunt folosite în domeniul dat pentru expresia proteinelor heterologe. Celulele gazdă folosite pe larg conțin tulpini de *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* și *Bacillus subtilis*. Intr-o variantă preferențială de executare, celula gazdă bacteriană este o celulă *E.coli*, cum ar fi o celulă care a fost obținută din tulpina BL21 *E.coli*.

45
50
Conform invenției, celula gazdă examinată pentru expresia proteinelor de interferon a fost manipulată genetic pentru inactivarea genei endogene *gor*, adică a genei care codifică oxidoreductaza glutation nativă a celulei gazdă. Gena care codifică oxidoreductaza glutation a fost detectată în câteva organisme diferite și este descrisă în literatură. În calitate de exemplu, secvența de nucleotide a genei *gor* a *E. coli* K12 este prezentată aici ca SEQ ID NO:5. În baza secvenței de nucleotide a genei *gor*, specialistul va putea să inactiveze ușor gena menționată prin metode genetice standard, cum ar fi mutageneza dirijată. Inactivarea genei *gor* va fi astfel încât în celula gazdă să nu fie sau în fond să nu fie nicio expresie a enzimei biologic active de oxidoreductază glutation. În prezenta invenție, gena *gor* se consideră inactivată, dacă manipularea genetică reduce cantitatea de enzimă funcțională de oxidoreductază glutation cu, cel puțin, 90%, de preferință 95% sau mai mult în comparație cu celula gazdă nemodificată.

55
Inactivarea poate fi realizată prin ștergerea unei părți sau a întregii secvențe de codificare a genei *gor* în celula gazdă. În mod alternativ, este, de asemenea, posibil de a introduce o substituție a unei nucleotide în secvența de codificare a genei, cu condiția că această substituție are loc într-un triplet care codifică un reziduu esențial al enzimei de oxidoreductază. Se poate de introdus, de asemenea, una sau mai multe nucleotide în porțiunea de codificare pentru a modifica cadrul de citire a genei *gor*. În altă variantă

preferențială de executare a invenției, gena *gor* este inactivată prin introducerea și excizia unui alt polinucleotid, de ex., a unei gene ce conferă rezistență față de un antibiotic care poate fi folosit pentru selecție. Metodele care pot fi folosite pentru inactivarea genelor în celulele bacteriene, de mamifere și de drojdie sunt bine cunoscute unui specialist în domeniul dat. De exemplu, numeroase metode pentru inactivarea unei gene bacteriene sunt descrise în literatură. Pe lângă aceasta, seturile pentru mutagenza dirijată sunt disponibile în vânzare, de ex., setul pentru mutagenza Quick-Change de la compania Stratagene, setul pentru mutagenza Transformer de la compania Clontech, sistemul de mutagenza GenTaylor de la compania Invitrogen, setul pentru mutagenza *in vitro* Altered Sites II de la compania Promega și setul pentru recombinare Red/ET de la compania Gene Bridges.

Inventatorii au depistat că inactivarea genei endogene *gor* a celulei gazdă este avantajoasă pentru obținerea cantităților mari de interferoni solubili exprimați recombinant. În mod surprinzător, celulele gazdă în care doar gena endogenă *gor* a fost inactivată produc cantități semnificativ mai mari de proteine de interferon în comparație cu celulele corespunzătoare care au genotipul *trxB/gor* (a se vedea Exemplul 6 de mai jos). Prin urmare, celulele gazdă examinate în prezenta invenție conțin o genă endogenă funcțională *trxB*, adică o genă *trxB* care este nativă celulei gazdă și produce reductaza tioredoxină enzimatic activă. Drept rezultat, celula gazdă conform invenției este capabilă să producă o enzimă funcțională nativă de reductază tioredoxină.

Este necesar de remarcat că tulpinile dublu inactivate *trxB/gor* sunt viabile, doar dacă ele prezintă o mutație în genă care codifică reductaza alchilhidroperoxid (*ahpC**). A se vedea Faulkner și alții (2008), PNAS, 105 (18) : 6735-40. Atât tulpina RHB-T7Agor/trx descrisă în invenție, cât și tulpina Origami (DE3) conțin astfel o mutație supresoare *ahpC**. În schimb, tulpinile care conțin doar o mutație *gor* inactivatoare sunt viabile fără o mutație *ahpC**, deoarece inactivarea genei *gor* ca atare nu are nici un efect letal. Astfel, tulpina RHB-T7Agor preparată în Exemplul 2 de mai jos nu conține o mutație supresoare *ahpC**.

În mod corespunzător, se preferă ca celulele gazdă examinate în prezenta invenție să cuprindă o genă endogenă, nemodificată, funcțională *ahpC*, adică o genă *ahpC* care este nativă celulei gazdă, nu conține o mutație supresoare și este capabilă să producă reductaza alchilhidroperoxid enzimatic activă.

Pentru a spori nivelul expresiei proteinei de interferon ce urmează a fi exprimată, celula gazdă din invenție poate cuprinde ARN-polimeraza dintr-un bacteriofag, cum ar fi polimeraza T7 ARN. Polimeraza T7 ARN asigură o expresie puternică și controlată a unei secvențe de polinucleotide care se conține într-un vector de expresie și precedată de un promotor T7. Gena polimerazei T7 ARN poate fi amplasată în celula gazdă în formă de un vector de expresie. Vectorul de expresie care conține gena polimerazei T7 ARN poate fi identic sau diferit de vectorul care include secvența interferonului pentru expresie. Se preferă, totuși, ca secvența care conține gena polimerazei T7 ARN să fie introdusă în genomul celulei gazdă, de ex., în cromozomul bacterian. De exemplu, gena polimerazei T7 ARN poate fi introdusă în genomul unei celule-gazde *E. coli*, iar polinucleotidul care codifică proteina de interferon, cum ar fi IFN- α 2a, este exprimat dintr-un vector de expresie care permite expresia în celulele *E. coli*. O casetă corespunzătoare de gene care include gena polimerazei T7 ARN poate fi introdusă în genomul unei celule gazdă bacteriene, de ex. prin recombinarea omologă descrisă în exemplele aduse mai jos. Pe lângă aceasta, celulele gazdă *E. coli* care cuprind gena polimerazei T7 ARN sunt, de asemenea, disponibile în vânzare, de exemplu, de la compania New England Biolabs (Frankfurt, Germania), a se vedea de exemplu NEB Cat# C2566, C3016, C3010, C3013, și vectorii din seria SHuffle, cum ar fi C3026, C3027, C3029 și C3030. De preferință, gena polimerazei T7 ARN este utilizată în combinație cu un polinucleotid de interferon, care a fost codon-optimizat pentru a fi exprimat într-un microorganism procariotic, cum ar fi o celulă *E. coli*.

Celula gazdă care a fost supusă manipulării în modul descris mai sus va fi prevăzută apoi cu o secvență de polinucleotide care codifică o proteină exogenă de interferon, de preferință o genă de interferon uman. Termenul „exogen” se referă la faptul că celula gazdă, care este selectată pentru expresia interferonului nu include în mod natural polinucleotidul, care codifică interferonul. Polinucleotidul poate fi introdus în celula gazdă, de ex., prin transformare sau transfecție. De preferință, secvența de polinucleotide ce codifică proteina de interferon care urmează a fi exprimată este inclusă într-un vector de expresie. Selectarea vectorului de expresie depinde mai ales de natura celulei gazdă.

De exemplu, dacă celula gazdă este o celulă de mamifere, cum ar fi celula CHO sau Vero, vectorul de expresie poate fi, de exemplu, un vector de expresie viral sau neviral util pentru introducerea în celulă a unui polinucleotid ce codifică interferonul pentru expresia ulterioară a proteinei de interferon codificată de polinucleotidul dat. Vectorul de expresie poate fi un vector epizomal, adică unul care este capabil de a se automultiplica în mod autonom în celula gazdă, sau un vector integrator, adică vectorul care se încorporează stabil în genomul celulei de mamifere.

Un vector de expresie al unui mamifer conține în mod normal un promotor, care este legat din punct de vedere funcțional cu polinucleotidul care codifică interferonul. Promotorii potriviți includ, dar nu se limitează la promotorul imediat precoce al citomegalovirusului (CMV-IE), promotorul U3 al virusului necrozei splinei și promotorul adenoviral major intarziat (Ad MLP). În calitate de component opțional, vectorul de expresie al unui mamifer poate include un amplificator potrivit pentru creșterea nivelului de expresie. Drept exemplu poate fi menționat amplificatorul precoce al genelor SV40 (Dijkema și alții (1985) EMBO J. 4: 761) și amplificatorul repetiției terminale îndelungate (LTR) a virusului Sarcoma Rous (Gorman și alții (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 6777). Vectorul de expresie conține, de asemenea, opțional secvențe de terminare a transcripției și secvențe de poliadenilare pentru îmbunătățirea expresiei proteinei de interferon. Semnale potrivite ale terminatorului transcripției și ale poliadenilării pot, de ex., rezulta din SV40 (Sambrook și alții (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual). Orice alt element, cunoscut în domeniul dat pentru sprijinirea expresiei eficiente, poate fi adăugat la vectorul de expresie, cum ar fi elementul post-transcripțional de reglare a hepatitei Woodchuck (wPRE).

Intr-un aspect deosebit de preferențial, vectorul de expresie este un vector de expresie viral. Vectorii virali care pot fi utilizați în prezenta invenției conțin în mod obișnuit un genom viral, în care o porțiune de secvență nativă este ștearsă pentru a introduce un polinucleotid heterogen fără a distruge infectivitatea virusului. Datorită interacțiunii specifice între componentele virusului și receptorii celulelor gazdă, vectorii virali sunt foarte potriviți pentru transferul eficient al genelor în celulele țintă. Vectorii virali potriviți pentru facilitarea transferului de gene într-o celulă de mamifere sunt bine cunoscuți în domeniul dat și pot fi obținuți din diverse tipuri de viruși, de ex., dintr-un retrovirus, adenovirus și virusul adeno-asociat (AAV), ortomixovirus, paramixovirus, papovavirus, picornavirus sau alfavirus. O prezentare generală a diverselor sisteme de vectori virali poate fi vizualizată la Nienhuis și alții, Hematology, Vol. 16: Viruses and Bone Marrow, N.S. Young (ed.), 353-414 (1993).

Pe de altă parte, dacă celula gazdă este o celulă bacteriană, cum ar fi o celulă *E. coli*, vectorul de expresie va fi adaptat la expresia proteinei într-un mediu al celulei procariotice. Un număr vast de vectori de expresie este descris pentru *E. coli* și alte celule gazdă bacteriene. Exemple de vectori potriviți pentru expresia proteinei în celulele *E. coli* includ, de ex., vectori din seria pBluescript, vectori din seria pUC, de ex., pUC18, pUC19, pBR322, pBR329, pQE70, pQE60, pQE-9, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK233-3, pDR540, pRIT5, pLG338, pKC30, pHSG299, pHSG399, pACYC177, pACYC184, pRSF1010, pBW22 și alții. Un vector preferat este acel ce aparține grupului de vectori pET. Vectorii pET conțin, de obicei, o genă *lacI* care poartă informații despre proteina represoare *lac*, un promotor T7, care este specific polimerazei T7 ARN, o secvență a terminației transcrierii, un operator *lac* care poate bloca transcrierea, un polilinker pentru clonare, o sursă de replicare *fl*, o genă de rezistență la ampicilină sau kanamicină și o sursă de replicare *ColEI*. Vectorii pET potriviți pentru folosirea în procedeele prezentei invenției includ, dar nu se limitează la pET-21a(+), pET-24a(+), pET-28a(+), pET-29a(+), pET-30a(+), pET-41a(+), pET-44a(+), pET-21b(+), pET-24b(+), pET-26b(+), pET-28b(+), pET-29b(+), pET-30b(+), pET-42b(+), pET-44b(+). Se preferă îndeosebi vectorii care se bazează pe stroma pET-26b(+). Exemple ulterioare de vectori potriviți sunt descriși, de ex., în publicația "Vectori de clonare" (Pouwels și alții (eds.) Elsevier, Amsterdam New York Oxford, 1985).

Un vector de expresie pentru utilizarea în celulele bacteriene poate fi transformat în celula gazdă prin orice metodă potrivită. De exemplu, un vector de expresie pentru utilizarea în *E. coli* poate fi introdus în celula gazdă, de ex., prin electroporație sau prin metode chimice, cum ar fi transformarea mediată cu fosfat de calciu, precum este descrisă în Maniatis și alții, 1982, Clonarea Moleculară, Manual de laborator, Cold Spring Harbor Laboratory.

Celulele gazdă și procedeele revendicate sunt utile pentru expresia recombinantă a cantităților mari de proteine de interferon solubil. Tipul interferonului nu este limitat în mod special. În general, proteinele de interferon selectate pentru expresia în celulele gazdă ale

invenției pot fi de origine umană sau non-umană. Polipeptidele de interferon de origine non-umană includ, de ex., interferoni de bovine, cabaline, porcine și șoareci, precum și proteinele respective de la câini, pisici, iepuri și oi. Alte tipuri de interferoni non-umani includ acei ce pot fi găsiți în primat, cum ar fi cimpanzei și gorile. Într-o variantă preferențială de executare, proteinele de interferon selectate pentru expresia în celulele gazdă ale invenției sunt interferoni umani, adică interferoni care se găsesc în mod natural în ființele umane, inclusiv variante alelice.

Proteinele de interferon pot aparține oricărei subclase de interferoni care este cunoscută în domeniul dat. În special, proteina de interferon pentru expresia în celula gazdă a invenției poate fi un interferon-alfa (IFN- α), un interferon-beta (IFN- β) sau un interferon-gamma (IFN- γ). Într-o variantă de executare îndeosebi preferențială, proteina de interferon pentru expresie este IFN- α , IFN- β sau IFN- γ uman sau un fragment biologic activ al acestuia. Procedeele, conform invenției, pot fi utile ulterior pentru expresia variantelor sau fragmentelor biologic active ale proteinelor IFN- α , IFN- β sau IFN- γ , precum este descris mai sus.

Într-o variantă de executare a invenției, IFN exprimat în celulele gazdă ale invenției este proteina matură nativă umană IFN- α . Cu toate acestea, prezenta invenție cuprinde, de asemenea, expresia variantelor și a fragmentelor biologic active ale IFN- α , care sunt descrise. IFN- α uman se întâlnește ca o familie din, cel puțin, 25 de proteine puternic omoloage din 166 de aminoacizi, care sunt codificați de gene diferite. Proteinele IFN- α inhibă replicarea virală și proliferarea celulară și modulează anumite reacții imune. IFN- α recombinant este utilizat în prezent în tratamentul hepatitei B și C și, de asemenea, în tratamentul leucemiei, melanomului malign și sarcomului Kaposi asociat cu SIDA. Printre IFN- α preferați pentru expresia conform invenției se numără IFN- α 2a, IFN- α 2b și IFN- α 2c. Secvența de aminoacizi a IFN- α 2a matur nativ uman este descrisă în SEQ ID NO:1.

Într-o altă variantă de executare, IFN exprimat în celulele gazdă ale invenției este proteina matură nativă umană de IFN- β sau o variantă, sau un fragment de IFN- β biologic activ, precum este descris mai jos. IFN- β uman este o glicoproteină care are o greutate moleculară de circa 20 kd. La fel ca IFN- α , acesta demonstrează o activitate antivirală puternică și, după cum se știe, inhibă proliferarea celulară. Forma matură a IFN- β uman are 166 de aminoacizi. IFN- β matur uman este arătat în SEQ ID NO:2. S-a depistat că IFN- β se leagă cu aceiași receptori ca și IFN- α .

Într-o altă variantă de executare a invenției, IFN exprimat în celulele gazdă ale invenției este proteina matură nativă umană de IFN- γ . Cu toate acestea, prezenta invenție cuprinde, de asemenea, expresia variantelor și a fragmentelor biologic active ale IFN- γ , care sunt descrise. IFN- γ este o glicoproteină care îndeplinește câteva funcții de reglementare în sistemul imunitar. De exemplu, eliberarea IFN- γ accelerează diferențierea celulelor B și stimulează producerea TNF- α . Pe lângă aceasta, s-a depistat că IFN- γ activează celulele epiteliale și endoteliale, fibroblastele și macrofagii pentru a elimina patogenii intracelulari. Efectele IFN- γ sunt mediate prin legarea proteinei de reglementare cu diverse forme de receptori pe suprafața celulelor receptive la IFN- γ . În forma sa matură, IFN- γ monomeric uman cuprinde 143 de aminoacizi și are o greutate moleculară de circa 17 kd. Secvența de aminoacizi a IFN- γ matur nativ uman este descrisă în SEQ ID NO:3.

Desigur, este posibil, de asemenea, de a utiliza celulele gazdă și procedeele descrise în prezenta invenție pentru producerea variantelor de interferon, care diferă într-o anumită măsură de proteinele de interferon sus-menționate, și, în special, acele prezentate în SEQ ID NOs:1-3. Aceste variante fiind, de obicei, variante biologic active, adică ele păstrează, cel puțin, o parte din activitatea biologică a interferonului în stare naturală, de ex., abilitatea de a se lega cu moleculele receptorilor respectivi. Analize potrivite pentru determinarea legării unei variante cu receptorul de interferon de tip I sunt descrise, de ex., în brevetul SUA nr. 5766864. În mod alternativ, activitatea biologică a unei variante de interferon poate fi determinată prin măsurarea activităților sale antiproliferative sau antivirale descrise, de ex., în brevetele SUA 5770191 și 5690925. De preferință, o variantă a interferonului menține o parte considerabilă a activității biologice a proteinei de interferon din care acesta este obținut, de ex., cel puțin, circa 50% din activitate, mai preferabil 60%, 70%, 80%, 90%, 95% sau mai mult.

Variantele includ proteine ce se găsesc în stare naturală și produse în mod recombinant, care diferă de secvența de aminoacizi inițială de referință prin una sau mai multe înlocuiri,

deleții sau completări ale aminoacizilor. De exemplu, o variantă de interferon uman $\alpha 2a$ poate avea o secvență de aminoacizi care diferă prin 2, 3, 4, 5, 6 sau până la 10, 20, 30 sau mai multe poziții de secvențele interferonului uman nativ $\alpha 2a$ descris în SEQ ID NO:1. Se preferă ca înlocuirile să fie conservative, adică înlocuiri ale unuia sau mai multor reziduuri aminoacide de aceeași polaritate, care acționează ca un echivalent funcțional. De preferință, reziduu de aminoacizi folosit în calitate de înlocuitor este selectat din aceeași grupă de aminoacizi ca și reziduu de aminoacizi ce urmează să fie înlocuit. De exemplu, un reziduu hidrofobic poate fi înlocuit cu un alt reziduu hidrofobic sau un reziduu polar poate fi înlocuit cu un alt reziduu polar care are aceeași sarcină. Aminoacizii funcțional omologi care pot fi folosiți pentru o înlocuire conservativă includ, de ex., aminoacizi nepolari, cum ar fi glicina, valina, alanina, izoleucina, leucina, metionina, prolina, fenilalanina și triptofanul. Exemple de aminoacizi polari neîncărcați includ serina, treonina, glutamina, asparagina, tirozina și cisteina. Exemple de aminoacizi (de bază) polari încărcăți includ histidina, arginina și lizina. Exemple de aminoacizi (acizi) polari încărcăți includ acidul aspartic și acidul glutamic.

De asemenea, în calitate de variante de interferoni sunt examinate proteinele care diferă de interferonul inițial prin unul sau mai mulți (de ex. 2, 3, 4, 5, 10, sau 15) aminoacizi adiționali. Acești aminoacizi adiționali pot fi prezenți în secvența de aminoacizi a proteinelor de interferoni inițiali (adică ca o inserție) sau pot fi adăugați la unul sau la ambele capete ale proteinei. În esență, inserțiile pot avea loc la orice poziție cu condiția că adăugarea aminoacizilor nu dăunează capacității proteinei de a exercita, cel puțin, o parte din activitatea biologică a proteinei de interferon ce se găsește în stare naturală. Mai mult decât atât, variantele includ, de asemenea, acele proteine în care, spre deosebire de proteina inițială, lipsesc unul sau mai mulți aminoacizi. Asemenea deleții pot fi făcute în privința oricărei poziții a aminoacizilor cu condiția că ele nu dăunează capacității unei asemenea variante să exercite, cel puțin, o parte din activitatea biologică exercitată de proteina de interferon ce se găsește în stare naturală.

Variantele proteinelor de interferon cuprind, de asemenea, proteine cu modificări structurale în raport cu proteinele care se găsesc în stare naturală, cum ar fi aminoacizii modificați. Conform invenției, aminoacizii modificați sunt aminoacizi care au fost modificați fie prin procese naturale, cum ar fi modificările de prelucrare sau post-translaționale, fie prin procese chimice. Modificările aminoacizilor care pot fi întâlnite în variantele de interferon obținute conform invenției pot include fosforilare, glicozilare, acetilare, acilare, ramificare, ribozilare ADF, reticulare, formarea punții disulfurice, formilare, hidroxilare, carboxilare, metilare, demetilare, amidare, ciclizare și/sau formarea legăturilor covalente sau necovalente cu fosfatidilinozitol, derivatele flavinei, acizii lipoteiconici, acizii grași sau lipidele. Asemenea modificări au fost descrise pe larg în literatură, de ex., în publicația: Proteine: Structura și proprietățile moleculare, T. Creighton, 2nd edition. H. Freeman and Company, New York (1993).

Variantele de interferon menționate în prezenta invenție prezintă, de preferință, o identitate semnificativă a secvenței de aminoacizi în comparație cu proteina de interferon inițială. De preferință, identitatea aminoacizilor constituie circa 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, și mai preferabil mai mult de 96%, 97%, 98%, sau 99%. În domeniul dat sunt bine cunoscute metode și programe de calculator pentru determinarea omologiei aminoacizilor. În prezenta invenție, identitatea secvenței este determinată cu ajutorul algoritmului de căutare a omologiei Smith-Waterman (Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981), 2:482-489).

Variante biologice active de proteine umane de interferon sunt descrise în domeniul dat. Variante de IFN- α uman pot fi găsite, de exemplu, în brevetul SUA 5676942, care oferă, de asemenea, informații cu privire la reziduurile și regiunile proteinei IFN- α care pot fi modificate fără pierderea activității biologice. Variante de IFN- γ uman sunt descrise, de ex., în brevetele SUA 5690925 și 6046034.

Celulele gazdă și procedeele propuse de prezenta invenție, de asemenea, pot fi utile pentru expresia fragmentelor biologice active ale proteinelor neprocesate de interferon sau ale variantelor acestora definite mai sus. După cum este utilizat în prezenta invenție, un fragment de proteină de interferon este o proteină, polipeptid sau peptid, care diferă de proteina corespunzătoare de interferon prin lipsa unuia sau mai multor aminoacizi la terminația-N și/sau terminația-C, unde cel puțin o parte din activitatea biologică a moleculei de interferon de referință, de ex., proprietățile sale de legare cu receptorii sau activitatea sa antivirală sau antiproliferativă, se păstrează. Se preferă ca fragmentele biologice active ale proteinelor de

interferon ce se găsesc în stare naturală sau fragmentele variantelor corespunzătoare de interferon să păstreze, cel puțin circa 50%, cel puțin circa 75%, de preferință cel puțin circa 80%, cel puțin circa 85%, cel puțin circa 90% sau chiar cel puțin până la circa 99% din activitatea biologică a interferonului de referință.

5 Fragmentele biologic active ale interferonilor umani au fost descrise anterior. De exemplu, fragmentele de IFN- γ sunt cunoscute din brevetul SUA nr. 5770191, în care sunt descrise fragmente ce cuprind aminoacizii 95-134 ale IFN- γ uman neprocesat. Fragmentele exercită activitatea biologică a IFN- γ matur. În EP 0306870 sunt descrise fragmente de IFN- γ uman care au o deleție a aminoacizilor 7-11 la terminația-C. Fragmentele demonstrează o

10 activitate sporită semnificativ în comparație cu IFN- γ uman neprocesat.

 În timpul clonării unei secvențe de polinucleotide, care codifică una dintre proteinele de interferon sus-menționate sau o variantă, sau un fragment biologic activ al acestora într-un vector bacterian de expresie, este necesar de a lua în considerare faptul că ar putea fi util de a modifica secvența de polinucleotide ce codifică interferonul în scopul adaptării ei la expresia procariotică. Metode de optimizare a utilizării-codon a unei secvențe de polinucleotide ce urmează să fie exprimată în scopul de a o face potrivită pentru expresia în celulele gazdă bacteriene, cum ar fi *E. coli*, sunt bine cunoscute în domeniul dat și sunt descrise, de ex., în Maertens și alții (2010), Protein Science, 19: 1312-1326.

 Pe scurt, secvența de polinucleotide care codifică proteina de interferon ce urmează a fi exprimată în celulele gazdă este manipulată prin adaptarea utilizării-codon la deplasarea-codon a *E. coli*. Segmentele cu un conținut foarte mare (> 80%) și foarte redus (< 30%) de GC nu au fost folosite după posibilitate. De asemenea, nu au fost folosite fragmente ale secvenței cis-activatoare, cum ar fi TATA-boxe interioare, chi-saituri și saituri de intrare ribozomale, secvențe repetate, structuri secundare ARN și secțiuni AT-bogate sau GC-bogate

25 ale secvenței. Optimizarea secvențelor de gene, cum ar fi secvențele umane de gene, pentru expresia în celulele gazdă bacteriene, precum celulele *E. coli* este, de asemenea, realizată de către furnizori precum Geneart (Regensburg, Germania).

 O secvență de polinucleotide ce codifică IFN- α 2a uman, care a fost optimizată pentru expresia în *E. coli* este prezentată în SEQ ID NO:4.

30 Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu de expresie recombinantă a unui interferon solubil, în care se folosește o celulă gazdă descrisă mai detaliat mai sus. Procedeu cuprinde etapele de

 (a) oferire a unei celule gazdă care cuprinde o genă endogenă funcțională *trxB*, o genă endogenă inactivată *gor* și o secvență de polinucleotide care codifică o proteină exogenă de interferon;

35 (b) cultivare a celulei gazdă în condiții care permit expresia proteinei de interferon; și

 (c) obținere a proteinei de interferon solubil din celula gazdă.

 Celula gazdă conține, de preferință, o copie a unei polimeraze ARN a bacteriofagului integrată în genomul său, de ex., polimeraza T7 ARN, și este transformată cu un construct de expresie epizomal, de ex., un vector de expresie ce include o secvență de polinucleotide care poartă informațiile unei proteine exogene de interferon. Gazda utilizată în metoda de expresie recombinantă a unui interferon solubil poate fi, în general, orice tip de celulă eucariotă sau procariotă, precum este descris în prezenta invenție. De preferință, celula gazdă este o celulă bacteriană, mai preferabil, o celulă *E. coli*.

45 Conform metodei propuse de prezenta invenție, celulele gazdă sunt cultivate în condiții care permit expresia proteinei de interferon. Condițiile specifice vor depinde de alegerea sistemului specific de expresie și, de asemenea, de astfel de factori, precum natura celulei gazdă, natura promotorului inducibil și alți factori. Specialistul va putea selecta și optimiza cu ușurință condițiile necesare pentru expresia eficientă a proteinei de interferon în cultura celulară fără efort inventiv.

50 De exemplu, cultivarea celulelor gazdă *E. coli* care exprimă o proteină de interferon poate fi efectuată conform procedeele standard de fermentare. De obicei, celulele *E. coli* pot fi cultivate printr-un procedeu periodic sau cu aprovizionare continuă (fed-batch). Procedeele de cultivare ale celulelor gazdă bacteriene sunt, în general, descrise în Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bio-separation, Volumes 1-5, Flickinger, M.C., Drew, S.W. (eds.), 1999 John Wiley & Sons. Condițiile tipice de temperatură pot varia între 20°C și 42°C, mai obișnuit între 30°C și 40°C și de preferință între 35°C și 38°C. Mediul de cultură va avea, de regulă, un pH cuprins între 6,5 și 9,0, mai specific între 7,0 și 8,0, de ex. 7,5. Fermentarea culturii va continua pe parcursul unei

55

perioade variind de la câteva ore până la câteva zile. În special, dacă cultivarea este efectuată printr-un procedeu periodic, timpul de cultivare variază, de obicei, între 12 ore și 36 de ore. În cazul utilizării unui procedeu continuu, perioadele de fermentare ar putea dura până la 21 de zile sau mai mult.

5 În ultima etapă a procedurii, proteina de interferon solubil este obținută din celula gazdă. De regulă, proteina este izolată din citozolul celulelor gazdă. Celulele pot fi distruse, de ex., cu o presă franceză, prin cicluri repetate de congelare și decongelare, sau prin prelucrarea cu ultrasunete. Fragmentele celulare pot fi înlăturate ușor din fracțiunea proteică prin centrifugare. Proteinele de interferon solubil pot fi, apoi, purificate de alte componente
10 proteice sau neproteice prin metode standard de cromatografie, inclusiv, de exemplu, cromatografia de excludere dimensională și/sau cromatografia cu transfer de ioni. De asemenea, pot fi utilizate și alte metode care sunt, de obicei, aplicate pentru purificarea proteinelor, cum ar fi precipitarea cu sulfat de amoniu și filtrarea și/sau dializa. Proteina de interferon exprimată de celula gazdă a invenției poate fi purificată, de asemenea, prin
15 purificarea afină cu ajutorul, de ex., a anticorpilor monoclonali sau policlonali ai interferonilor.

Pentru a simplifica purificarea, interferonul obținut conform procedurii invenției poate fi exprimat ca o proteină de fuziune, care cuprinde un marcaj de afinitate ce facilitează legătura
20 proteinei de fuziune printr-un compus ce demonstrează afinitatea de legătură cu marcajul. De ex., marcajul de afinitate poate fi un marcaj de polihistidină ce cuprinde 6-12 reziduuri de histidină care interacționează în mod specific cu o matriță chelatică din nichel și ioni. În mod alternativ, marcajul poate fi glutation-S-transferaza care permite efectuarea purificării pe o matriță de glutation. Alte marcaje de afinitate sunt bine cunoscute în domeniul dat. Exemple nelimitative de perechi de marcaj de afinitate și ligand de afinitate includ următoarele:
25 proteina de legare a maltozei (PLM) și maltoza; avidina și biotina; Streptag și streptavidina; epitopul myc și anticorpul. Dacă marcajul de afinitate este o peptidă sau polipeptidă, un asemenea marcaj poate fi exprimat ușor împreună cu proteina de interferon ca un produs unic al expresiei. Dacă marcajul de afinitate nu este de origine proteică, acesta poate fi atașat prin reacții chimice de cuplare. De exemplu, biotina poate fi cuplată chimic cu proteina de
30 fuziune.

De preferință, cel puțin 50% de interferon obținut conform procedurii invenției este interferon activ. Mai preferabil, cel puțin 60%, cel puțin 70%, cel puțin 80%, cel puțin 90% sau cel puțin 95% de interferon obținut conform procedurii invenției este interferon activ.

Invenția se explică cu ajutorul fig. 1-4, care reprezintă:

35 - fig.1, o comparație a nivelurilor de proteine IFN α 2a în RHB-T7/pET26b (+) . IFN α 2a și RHB-T7 Δ gor/pET26b (+) . IFN α 2a conform determinării cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu (SDS-PAGE) până la (t0) și 3 ore după inducția cu ajutorul IPTG (t3). Se poate vedea că ambele clone exprimă IFN α 2a în cantități similare;

40 - fig. 2, rezultatele unei analize SDS-PAGE a fracțiunilor de proteine solubile și insolubile de RHB-T7/pET26b (+) . IFN α 2a și RHB-T7 Δ gor/pET26b (+) . IFN α 2a 3 ore după inducția cu ajutorul IPTG (t3). În timp ce cultura RHB-T7/pET26b (+) . IFN α 2a a produs în special interferon insolubil (a treia bandă în panoul din stânga), RHB-T7 Δ gor/pET26b (+) . IFN α 2a a oferit un produs de proteină predominant solubil (a doua bandă în panoul din dreapta);

45 - fig. 3, comparația expresiei IFN α 2a în tulpinile RHB-T7 Δ gor, RHB-T7 Δ gor/trx și Origami (DE3), care au fost toate transformate anterior cu vectorul de expresie pET26b (+) . IFN α 2a. În panoul A sunt arătate rezultatele după analiza SDS-PAGE. În panoul B sunt arătate rezultatele imunoblotingului și detectării cu ajutorul chemoluminescenței. t0: neindusă; t4: indusă timp de 4 ore cu ajutorul IPTG; I; corpuscul de incluziune sau fracțiune insolubilă; C: citozol sau fracțiune solubilă; Ctrl: IFN α 2a recombinant (Roferon®); LM: markerul masei moleculare Invitrogen);

50 - fig. 4, secvența de nucleotide care poartă informații despre IFN α 2a uman care a fost optimizată cu privire la utilizarea-codon pentru expresia recombinantă într-o celulă gazdă *E. coli*.

EXEMPLE

Invenția va fi ilustrată în continuare prin următoarele Exemple care sunt prezentate doar pentru exemplificare. În mod specific, Exemplele descriu prepararea unei celule gazdă *E. coli* cu o genă exogenă de polimerază T7 ARN și o genă endogenă *gor* care a fost inactivată prin recombinația omologă. Exemplele descriu, de asemenea, expresia recombinantă a interferonului uman alfa, beta și gamma în celula gazdă menționată *E. coli*.

Exemplul 1: Prepararea unei tulpini *E. coli* controlate de T7

O tulpină producătoare *E. coli* ce conține o genă genomică de polimerază T7 ARN sub controlul represorului *lacI* a fost preparată cu ajutorul tehnologiei Red/ET pentru recombinația omologă (Gene Bridges, Heidelberg, Germania) pornind de la tulpina BL21. Prepararea tulpinii producătoare a inclus următoarele etape:

a) Amplificarea și clonarea unei casete genetice T7

ADN-ul genomic al BL21-DE3 *E. coli* (Novagen) a fost preparat cu ajutorul unui set standard (Qiagen, Hilden, Germania). Casetă genetică 4.44 kb la-CUV5-T7 a BL21-DE3 a fost amplificată de reacția RLP. Casetă ADN-ului conținea gena *lacI*, domeniul de reglare a operonului *lac*, o genă parțială *lacZ* și gena 1 a fagului T7 *E. coli* care codifică polimeraza ARN T7. Amestecurile reacției RLP conțineau tamponul polimerazei ADN KOD Hot Start, 2 mmoli de $MgSO_4$, 200 μ moli dNTPs, polimeraza ADN 1 U KOD Hot Start (Novagen), 10 μ moli de primer direct (λ int1), 10 μ moli de primer inversat (λ int2) și 50 ng de matriță ADN. A fost folosit un amplificator Mastercycler gradient (Eppendorf) cu următoarele setări: denaturare timp de 2 min la 98°C, urmată de 34 cicluri a câte 30 s la 98°C, 30 s la temperatura de hibridare de 60,5°C, și 2 min de elongație la 72°C. Elongația finală a fost efectuată timp de 7 min la 72°C.

Au fost utilizați următorii primeri:

λ int1: GTCCGACTTATGCCCCGAGAAGATGTTGAGCAAACCTTATCGCTTATC
(SEQ ID NO:6);

λ int2: TGCAAAGAGATTCTTGGCGGAGAAACCATAATTGCATCTACTCG
(SEQ ID NO:7);

Produsul obținut al RLP a fost folosit ulterior în calitate de matriță pentru reamplificarea în aceleași condiții RLP pentru crearea sait-urilor de restricționare pentru *PstI* și *SalI* pentru caseta T7. Următorii primeri au fost folosiți pentru reamplificarea RLP:

PstI-direct: GGAAGCGGGCCTGCAGCGGACACCATCGAATGGCGC (SEQ ID NO:8); și

SalI -inversat: GGGGGGGGGGTCGACGGAGTCGTATTGATTTGGCG (SEQ ID NO:9).

În urma analizei de restricționare și eluării fragmentului obținut din gelul de agaroză cu ajutorul setului de extragere a gelului QIAquick (Qiagen, Hilden, Germania) s-a efectuat o reacție de ligatură (set de ligatură rapidă ADN, Roche) cu o plasmidă pIBD5 dezintegrată cu *PstI/SalI* (care include un promotor T5, inducibil de IPTG). 100 μ l de celule K12 DH10B *E. coli* au fost transformate prin electroporație, după cum este descris în invenție, plasate pe plăci de geloză LB care conțin kanamicină (Kan) și cultivate la 37 °C timp de o noapte. O clonă a fost cultivată pe plăci pentru prepararea plasmidei ADN (setul Qiaprep Spin Miniprep; Qiagen), dezintegrată cu *PstI/SalI* și inserarea corectă a casetei de polimerază T7-ARN (RNAP) a fost verificată cu electroforeza cu gel de agaroză. Vectorul nou proiectat a fost numit pSI. Gena T7 RNAP în pSI a fost supusă secvenționării (GATC Biotech AG). Plasmida pSI aprobată a fost utilizată în calitate de matriță pentru crearea ADN-ului linear pentru etapa de recombinație conform protocolului tehnic al producătorului (Gene Bridges).

b) Prepararea ADN-ului linear pentru recombinația omologă

Pentru crearea ADN-ului linear pentru recombinație, caseta T7 și gena de rezistență la kanamicină din pSI au fost amplificate cu ajutorul RLP, prin adăugarea brațelor omoloage pe oricare dintre fețele care constituie fragmente de secvenționare ADN omoloage ADN-ului

locusului dorit de integrare genomică, adică locusul *recA* a *E. coli*. Amestecurile reacției RLP conțineau tamponul polimerazei ADN KOD Hot Start, 2 mmoli MgSO₄, 200 μmoli dNTPs, 1 U de polimerază ADN KOD Hot Start (Novagen), 10 μmoli de primer direct (5'harecA), 10 μmoli de primer inversat (3'harecA) și 50 ng de matriță ADN. A fost folosit un amplificator

5 Mastercycler gradient (Eppendorf) cu următoarele setări: denaturare timp de 2 min la 98°C, urmată de 35 cicluri a câte 30 s la 98°C, 30 s la temperatura de hibridare de 65,5°C, și 2 min de elongație la 72 °C. Elongația finală a fost efectuată timp de 7 min la 72 °C. Au fost utilizați următorii primeri

5'harecA:

10 TCGCTATCATCTACAGAGAAATCCGGCGTTGAGTTCGGGTTGCTCAGCAGCTA
GATGCATGCTCGAGCGG (SEQ ID NO:10);

3'harecA:

15 GTAAAGGCTCCATCATGCGCCTGGGTGAAGACCGTTCCATGGATGTGGA
CTGCTGAAGCCAGTTACC (SEQ ID NO:11).

Produsele RLP au fost purificate cu ajutorul unui set de purificare a RLP QIAquick (Qiagen) și dezintegrate cu ajutorul a 10 unități de *DpnI* timp de 30 min la temperatura de 37°C.

20

c) Transformarea celulelor *E. coli* competente

Celulele *E. coli* au fost transformate cu ajutorul plasmidei pRed/ET prin electroporația celulelor BL21 (Novagen). Așadar, 1 μl de plasmidă ADN pRed/ET a fost adăugat la o parte alicotă de 50 μl de celule electrocompetente, transferat într-o chiuvetă pentru electroporație de 1 mm și electroporat cu 1350 V cu ajutorul electroporatorului #2510 (Eppendorf). Timpul constant trebuie să fie între 5,0 și 5,4 ms. S-a adăugat 1 ml de mediu LB răcit în prealabil (1% peptonă de soia, 0,5% extract de drojii, 1% NaCl, pH 7,0), mostra a fost transferată într-un tub de 1,5 ml și incubată într-un termoamplificator timp de 1 oră la 30°C și 800 rpm. 100 μl de suspensie celulară a fost plasată pe geloză LB plus tetraciclină (3 pg/ml), plăcile au

25

30

35

40

Aceste culturi au fost apoi transformate cu ajutorul ADN-ului linear (a se vedea mai sus) care conține T7 și gena de rezistență la kanamicină din pSI, precum și brațele omologice pentru recombinație. 400...800 ng de fragment linear RLP au fost adăugate atât la celulele induse, cât și la cele neinduse și suspensia a fost electroporată la tensiunea de 1350 V. S-a atras atenția ca volumul mostrei de ADN să nu depășească 4 μl. S-a adăugat 1 ml de mediu LB rece ca gheața și celulele au fost incubate timp de 3 ore la 37 °C, 800 rpm. După centrifugare celulele au fost suspendate din nou în 100 μl de mediu LB, plasate pe geloză LB plus antibioticul selectat în concentrația recomandată și incubate timp de o noapte la 37°C. Au fost identificate două clone. Recombinarea reușită a casetei în locusul *recA* în BL21 în aceste clone a fost confirmată de colonia RLP. În urma analizei întregii secvențe integrate (lacI, ΔlacZ și gena polimerazei T7 ADN) s-a depistat identitatea absolută cu secvența inițială a acestei regiuni în BL21-DE3. Tulpina nouă a fost desemnată RHB-T7 Kah^f.

45

50

d) Eliminarea genei de rezistență la kanamicină

După cum s-a descris mai sus, tulpina nouă RHB-T7 Kan^r conține o genă de rezistență la kanamicină în genomul bacterian. Dat fiind că celulele create prin procesele de recombinație erau destinate utilizării cu vectorii pET, era necesară optimizarea ulterioară pentru evitarea rezistenței duble (genomică și episomală). Astfel, gena genomică de rezistență la kanamicină a fost distrusă prin inserarea în locusul kanamicinei a unei casete de rezistență la cloramfenicol flancată cu FRT prin recombinația omologă. Ulterior, un alt proces de

55

recombinare controlat de proteina *flp* a dus la deleția a circa 60% din gena de rezistență la kanamicină. Acest mutant inactivat permite selectarea transformanților pET datorită genei epizomale (*Kan*) de rezistență la kanamicină.

5 Gena de rezistență la kanamicină a fost înlăturată din genom după cum urmează: Un produs linear RLP al casetei de rezistență la cloramfenicol flancată cu FRT cu fragmente de secvenționare ADN 5' și 3' omoloage părților genei de rezistență la kanamicină, a fost integrat în locusul genomic al kanamicinei în tulpina RHB-T7 Kan^r prin recombinația omologă. În acest scop, a fost utilizată tehnologia Red/ET pentru recombinația omologă (Gene Bridges, Heidelberg, Germania). Pe scurt, celulele electrocompetente RHB-T7 Kan^r au fost transformate cu plasmida pRed/ET conform protocolului producătorului (a se vedea mai sus). Selectarea a fost efectuată pe plăcile de tetraciclină și clonele pozitive au fost transformate cu ajutorul unui fragment linear RLP care conținea brațe omologice 5' și 3' ale secvenței genetice Kan^r și ale genei de rezistență la Cm flancată cu FRT. Transformanții au fost verificați prin analiza RLP pentru a verifica genomul modificat. Șapte clone unice au fost analizate prin metoda coloniei RLP cu privire la inserția corectă în locusul kanamicinei a RHB-T7 Kan^r. Toate cele șapte clone analizate au fost pozitive. Una dintre aceste clone a fost transformată cu ajutorul plasmidei pFLP707 furnizată de compania Gene Bridges. Această plasmidă poartă gena *flp* a recombinazei sub controlul transcripțional al unui promotor termosensibil, al unei surse termosensibile a replicii și al genei de rezistență la tetraciclină pentru selectarea transformanților.

20 O singură clonă a acestei transformări a fost cultivată la 30°C. O deviere a temperaturii până la 37 °C a indus atât expresia proteinei *flp* a recombinazei, cât și pierderea plasmidei pFLP707, inclusiv rezistența la tetraciclină. Celulele au fost plasate pe geloză LB și clonele separate au fost analizate prin colonia RLP cu privire la procesele recombinării pozitive *flp*.

25 Trei colonii care poartă casetă de rezistență la cloramfenicol flancată cu FRT au fost cultivate într-un microtub cu 1,0 ml de mediu LB și 15 μg/ml de cloramfenicol. O gaură a fost perforată în capac pentru alimentarea cu aer. Cultura a fost incubată timp de o noapte la temperatura de 37 °C prin agitare la 800 rpm. Un microtub cu 1,4 ml de mediu LB și 15 μg de cloramfenicol a fost inoculat cu 30 μl de cultură proaspătă nocturnă, incubată timp de 30...3 ore la 37 °C prin agitare la 900 rpm. Celulele au fost centrifugate timp de 30 s la 11 000 rpm într-un microtub răcit, iar supernatantul a fost eliminat prin descărcare. Precipitatul a fost resuspendat în 1 ml de H₂O dd răcită. Centrifugarea și resuspensia a fost repetată încă o dată. După centrifugare supernatantul a fost descărcat încă o dată și 20...30 μl au fost lăsate în tub cu precipitatul. Celulele au fost resuspendate și menținute permanent pe gheață. Electroporația a fost efectuată cu 1 μl ADN pFLP707. După incubarea nocturnă pe plăci de tetraciclină la 30°C, s-a inoculat 1 ml de mediu LB într-o colonie și s-a incubat la 30 °C timp de 2...3 ore. Temperatura a fost schimbată până la 37 °C și cultura a fost incubată timp de o noapte. O picătură de suspensie celulară a fost plasată pe geloză LB. După incubarea timp de o noapte la temperatura de 37 °C coloniile unice au fost analizate prin intermediul RLP cu privire la eliminarea cu succes a markerului de selectare cloramfenicol. Suplimentar, coloniile au fost reimprimare atât pe geloză LB, cât și geloză LB condiționată cu 15 μg/ml cloramfenicol pentru selectarea clonelor pozitive. Două clone pozitive au fost identificate după pierderea rezistenței la cloramfenicol. Aceste clone au fost confirmate prin analiza secvenței zonei genomice respective. Tulpina nouă a fost numită RHB-T7.

45

Exemplul 2: Distrugerea genei *gor*

Pentru prepararea celulelor electrocompetente, 20 ml de mediu LB au fost inoculate într-o cultură nocturnă de RHB-T7 pentru a atinge densitatea optică de pornire OD₆₀₀ de circa 0,1. Celulele au fost crescute la 37 °C până la densitatea optică OD₆₀₀ de circa 0,6. Cultura a fost centrifugată la 4°C timp de 10 min și 4600 rpm. Supernatantul a fost eliminat, iar precipitatul a fost resuspendat în 14 ml de glicerină de 10% rece ca gheața. După centrifugare (aceleași condiții ca și cele menționate mai sus), etapa de spălare a fost repetată. În cele din urmă, precipitatul a fost resuspendat în 700 μl de glicerină de 10%, și alicote de 50 μl ale suspensiei celulare au fost congelate imediat în azot lichid.

55

1 μl de plasmidă ADN pRed/ET s-a adăugat la o alicotă de 50 μl a celulelor electrocompetente. După amestecare, proba a fost păstrată pe gheață. Proba pentru transformare a fost transferată într-o chiuvetă de electroporație de 1 mm și electroporată la 1350 V cu ajutorul electroporatorului #2510 de la compania Eppendorf cu un timp constant între 5,0 și 5,4 ms. S-a adăugat 1 ml de mediu LB răcit în prealabil, proba a fost transferată

intr-un tub de 1,5 ml și incubată într-un termoamplificator timp de 1 oră la 30°C și 800 rpm. 100 μl de suspensie celulară au fost plasați pe geloză LB plus tetraciclină (3 μg/ml) și plăcile au fost incubate timp de o noapte la 30°C.

O singură colonie a fost luată de pe plăcile de electroporație a plasmidei pRed/ET și incubată timp de o noapte în 1 ml de mediu LB plus tetraciclină la 30°C, prin agitare la 800 rpm. 30 μl din cultura respectivă au fost transferați în două tuburi care conțineau 1,4 ml de mediu LB plus antibiotic. Celulele au fost crescute timp de aproximativ 2 ore la 30 °C până la atingerea unei densități optice de circa 0,3. O cultură a fost indusă prin adăugarea a 50 μl de L-arabinoză de 10%, iar cealaltă a fost lăsată neindusă și folosită în calitate de control negativ. Ambele culturi au fost incubate la 37°C, 800 rpm timp de circa o oră. Pentru a obține celule competente, ambele culturi au fost centrifugate la 4°C, 13 000 rpm, spălate de două ori cu 1 ml de glicerină de 10% răcită în prealabil și resuspendate în circa 50 μl de glicerină de 10%. Aceste celule au fost utilizate pentru transformarea cu un fragment linear RLP ce conține brațe omoloage 5' și 3' ale secvenței genei *gor*.

Caseta de rezistență FRT-Cm-FRT de la compania Gene Bridges (Heidelberg, Germania) a fost folosită ca matriță pentru distrugerea genei cromozomice *gor* în RHB-T7 obținută în Exemplul 1. Reacțiile RLP au fost efectuate cu ajutorul unui amplificator Mastercycler gradient de la compania Eppendorf cu următoarele setări: denaturare inițială timp de 2 min la 98°C, urmată de 34 cicluri a câte 30 s la 98°C, 30 s la 60°C - temperatura de hibridare, și 1,5 min de elongație la 72 °C. Elongația finală a fost efectuată timp de 7 min la 72 °C și păstrarea a avut loc la 4°C. A fost folosită polimeraza ADN KOD Hot Start (Novagen) și următorii primeri:

5' hagog :

AACGTGCTCGGTAAAAATAACGTTGATGTAATCAAAGGCTTTGCCCGCTTAAT
TAACCCTCACTAAAGGGCGG (SEQ ID NO:12);

3' hagog:

GATCGGCCGTGATGGTTTCGCCGTTTACCTCCAGCGTTTTGGCATCAACGTAA
TACGACTCACTATAGGGCTCG (SEQ ID NO: 13);

Astfel, s-a obținut 1,5 kb de produs RLP ce conținea gena de rezistență la cloramfenicol flancată de site-urile FRT și 50 perechi de bază (p.b.) de brațe omoloage *gor*. Produsele RLP au fost purificate cu un set de purificare QIAquick (Qiagen). 400...800 ng de fragment linear RLP, care conținea brațe omoloage 5' și 3' ale secvenței genei *gor* și ale genei de rezistență la Cm flancată cu FRT, au fost adăugate atât la celulele induse, cât și la cele neinduse precum au fost preparate mai sus și suspensia a fost electroporată cu 1350 V.

Produsul purificat RLP a fost folosit pentru electroporația RHB-T7 transformat cu vectorul pRed/ET (Gene-Bridges) și astfel preparat pentru recombinarea omologă. Procesul de recombinare a dus la integrarea exactă a casetei markerului de rezistență în locusul *gor* al genomului RHB-T7. Distrugerea cu succes a genei *gor* a fost confirmată prin RLP. S-a atras atenție la faptul ca volumul probei ADN să nu depășească 4 μl. S-a adăugat 1 ml de mediu LB rece ca gheața și celulele au fost incubate timp de 3 ore la 37 °C, 800 rpm. După centrifugare, celulele au fost resuspendate în 100 μl de mediu LB, plasate pe geloză LB cu cloramfenicol și incubate timp de o noapte la 37 °C. Recombinarea cu succes în genom a fost verificată cu ajutorul coloniei RLP. Aceste reacții RLP, precum și rezultatele experimentelor de reimprimare au demonstrat că caseta markerului de rezistență a fost integrată cu succes. Clonele pozitive au fost transformate cu plasmida pFLP707 (Gene Bridges), precum este descris în Exemplul 1, pentru a iniția eliminarea markerului de rezistență. Pierderea markerului de rezistență a fost confirmată prin RLP și reimprimarea coloniilor.

Integrarea și flipping-ul au dus la distrugerea cadrului deschis de citire *gor* și astfel au creat o tulpină mutantă cu deficiență de *gor*. Acest fapt a fost verificat prin analiza de secvenționare. Cadrul deschis de citire *gor* în RHB-T7 *gor*- oferă o proteină trunchiată cu oprirea translației la TAA în poziția 364-366 (116 triplet al proteinei de tip sălbatic). Secvența promotorului T3, site-ul țintei de recombinare a flipazei (FRT) și secvența promotorului T7 rămân în cromozom după procesul de flipping și astfel provoacă distrugerea cadrului de citire. Tulpina nouă a fost numită RHB-T7Δgror.

Exemplul 3: Construcția pET26b(+).IFN α 2a

Construcția vectorului de expresie pET26b(+).IFN α 2a s-a efectuat după electroforeza pe gel de agaroză și eluarea gelului a fragmentului de plasmidă (Invitrogen) Nde/Sal-dezintegrat pET26b(+), precum și a fragmentului de inserție IFN α 2a Nde/Sal-dezintegrat și codon-optimizat (pMA0813119, GeneArt). În baza acestor două fragmente izolate de ADN (setul Qiagen minelute pentru extragerea gelului) s-a efectuat o reacție de ligatură cu ajutorul setului Roche Rapid pentru ligatura ADN. După transformarea celulelor chimic competente DH10B *E. coli* cu o parte alicotă a amestecului de ligatură, au fost luate colonii separate de pe plăcile LB ce conțineau kanamicină și au fost cultivate timp de o noapte la 37°C în mediu LB lichid ce conținea 50 μ g/ml de marker selectat. După aceasta, ADN-ul plasmidei a fost izolat din fiecare clonă și dezintegrat cu ajutorul enzimelor de restricționare Nde/Sal. Dezintegrarea a dus la obținerea fragmentului Nde/Sal de circa 550 p.b. în două clone cu un fragment al vectorului de mărime corectă >5000 p.b. Pentru a confirma faptul că clonele cuprind vectorul corect de exprimare pET26b (+)IFN α 2a, clona 1 a fost supusă unei dezintegrări mai specifice cu ajutorul diferitor enzime de restricționare, cum ar fi PstI, BglII, BspHI și SspI. Rezultatul dezintegrării de restricționare și electroforeza cu gelul de agaroză au confirmat numărul și mărimile corecte ale fragmentelor ADN. Astfel, vectorul de expresie pET26b (+)IFN α 2a a fost transformat în celulele competente RHB-T7 Δ gor și a dus la obținerea coloniilor rezistente la kanamicină, dintre care au fost alese cinci la întâmplare pentru inocularea a 3 ml de culturi lichide ce conțineau kanamicină și pentru păstrarea criomaterialelor corespunzătoare la -80°C.

Exemplul 4: Analiza expresiei IFN α 2a

Celulele *E. coli* din tulpinile RHB-T7 și RHB-T7 Δ gor descrise mai sus au fost cultivate până la faza creșterii logaritmice medii. Celulele au fost centrifugate (1 min/16 100 x g/0°C) și resuspendate în glicerină de 10% rece ca gheața și centrifugate din nou (1 min/16 100 x g/0°C). Această etapă de spălare a fost repetată o singură dată. După a doua spălare celulele au fost resuspendate în 50 μ l de glicerină de 10% rece ca gheața și suspensia a fost transferată într-o chiuvetă pentru electroporație răcită în prealabil (Spațiu: 2 mm). În chiuvetă s-a adăugat o alicotă a vectorului de expresie pET26b(+). IFN α 2a și electroporația s-a efectuat cu un electroporator (Eppendorf AG, Germania) prin aplicarea a 1350 V. După electroporație, s-a adăugat 1 ml de mediu LB răcit în prealabil și suspensia celulară a fost transferată într-un tub proaspăt. După incubarea timp de o oră la 37 °C prin agitare (250 rpm) o alicotă de 50 μ l a fost distribuită pe o placă de geloză LB, completată cu 50 μ g/ml de kanamicină și incubată timp de o noapte la 37 °C. Coloniile unice de pe plăcile de transformare au fost preluate și utilizate pentru inocularea a 3 ml de culturi (mediu LB, completat cu 50 μ g/ml de kanamicină). După incubarea timp de o noapte (37°C/250 rpm) materialele primare pentru criopăstrare au fost preparate în felul următor: 1 ml de probă de cultură a fost amestecată cu 0,5 ml de glicerină sterilă rece ca gheața de 30% într-un criotub (concentrația finală a glicerinei de 10%). După înghețarea materialului în azot lichid (LN2) tuburile au fost păstrate la -80°C.

Clonele obținute prin transformarea RHB-T7 și RHB-T7 Δ gor cu ajutorul vectorului de expresie pET26b (+). IFN α 2a au fost desemnate ca RHB-T7/pET26b (+). IFN α 2a și RHB-T7 Δ gor/pET26b (+).IFN α 2a, respectiv. Identitatea și integritatea vectorului de expresie pET26b (+). IFN α 2a în diferite clone obținute prin transformare a fost confirmată prin analiza fragmentării ADN cu ajutorul enzimelor de restricționare BglII, BspHI, NdeI, PstI, Sall și SspI.

Cultivarea RHB-T7/pET26b (+).IFN α 2a și RHB-T7 Δ gor/pET-26b (+).IFN α 2a pentru obținerea IFN s-a început prin inocularea a 3 ml de mediu complex [veg.] (27,0 g/L peptonă vegetală, 14,0 g/L extract de drojdii, 5,0 g/L NaCl, 0,5 g/L MnSO $_4$ *H $_2$ O, 25,0 g/L (m/v) glicerină, 8,65 g/L K $_2$ HPO $_4$, 6,85 g/L KH $_2$ PO $_4$; pH 7,0 \pm 0,1) din criomateriale. La mediu s-a adăugat 50 μ g/ml de kanamicină. Culturile au fost incubate la 37 °C, 250 rpm timp de o noapte. 15 ml de culturi de expresie au fost inițiate cu ajutorul alicotelor de 3 ml de culturi nocturne pentru a atinge densitatea optică de pornire DO $_{600}$ 0,1 în 15 ml de mediu complex [veg.] fără antibiotice într-un flacon vibrator cu despărțituri la 37°C, 250 rpm. După atingerea fazei creșterii logaritmice medii cu densitatea optică OD $_{600}$ 0,5 – 0,8, s-a adăugat IPTG (concentrația finală de 1 mm) și culturile au fost cultivate încă 3 ore. 1 ml de probe de culturi au fost preluate imediat înainte de (t $_0$) și 3 ore după (t $_3$) inducția IPTG.

Probe de culturi de 1 μ l au fost centrifugate (1 min/16 100 x g/0°C). Reziduurile celulare au fost resuspendate în 4 ml de tampon Tris-EDTA (pH 7,4), transferate într-un tub de sticlă (diametrul interior de 22 mm) și plasate într-o baie cu gheață. Fraționarea celulelor s-a efectuat cu ajutorul dispozitivului cu ultrasunete UP 400S (Hielscher Ultrasonic GmbH; caracteristicile: 400W, 24 kHz) echipat cu sonda H3. Setările tehnice: adâncimea scufundării: 5 aprox. 15 mm; capacitatea: 75%; ciclul: 30 s, distrugere cu ultrasunet – 30 s intrerupere; perioada totală de prelucrare: 10 min. După aceasta, proba a fost transferată într-un tub de 15 ml de tip Falcon și centrifugată (30 min/4080 x g/4°C). Frațiunea proteinei insolubile a format un reziduu. Supernatantul ce conținea proteine solubile a fost transferat într-un tub de 10 15 ml de tip Falcon, la care s-au adăugat 600 μ l de acid tricloracetic de 100% (concentrația finală: 15%) și s-a incubat timp de o oră la 4°C înainte de centrifugare (30 min/4 080 x g/4°C). Reziduu din etapa dată reprezintă fracțiunea proteinei solubile. Ambele reziduuri au fost solubilizate și ajustate până la o densitate optică de $DO_{600} = 10$ prin adăugarea tamponului IB (8 moli uree, 50 mmoli DTT, 100 mmoli Tris-HCl; pH 8,0). O etapă de 15 standardizare până la densitatea optică de $DO_{600} = 10$ a făcut posibilă compararea directă a cantităților relative de proteine în diferite benzi de curgere a gelului. Pentru estimarea indicilor de producere a proteinelor era necesar de luat în considerare DO_{600} măsurată eficient a culturii analizate.

Proteina totală celulară (TCP) și fracțiunile proteinelor solubile și insolubile au fost 20 supuse SDS-PAGE cu colorarea cumasi. Pentru toate curgerile de gel SDS-PAGE au fost utilizate geluri pre-turnate NuPAGE® Novex® 12% Bis-Tris (Invitrogen, Karlsruhe, Germania) în combinație cu sistemul corespunzător XCell SureLock Mini-Cells (Invitrogen). Conform mărimii IFN α 2a recombinant (19 kDa), a fost aplicat un sistem de tampon MES (Invitrogen) pentru a atinge cea mai bună dizolvare a gelului. Toate probele au fost dizolvate 25 în 0,25 vol. de tampon LDS (Invitrogen), substituit cu 0,1 vol. de agent reducător Sample Reducing Agent (Invitrogen), și au fost încălzite timp de 10 min până la 95 °C înainte de a fi încărcate pe gel. Pentru colorarea cumasi s-a folosit sistemul Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad, Munich, Germania) conform recomandărilor furnizorului. Probele pentru analiză cu ajutorul stației de electroforeză (Experion, Bio-Rad Laboratories, Hercules, SUA) au fost 30 prelucrate conform instrucțiunii producătorului pentru condițiile reducătoare (Instrucțiuni de utilizare la setul de analiză Experion Pro260) și încărcate pe un chip Experion Pro260 (Bio-Rad). Înregistrarea și analiza ulterioară a datelor a fost efectuată cu ajutorul instrumentului de lucru cu sistemul Softul Experion și analiza datelor (Bio-Rad, Versiunea 3.0.226.0).

Rezultatele: 3 ore după inducție atât RHB-T7/pET26b(+).IFN α 2a, cât și RHB-T7 Δ gor/pET2 6b(+).IFN α 2a au demonstrat benzi proeminente de proteine aprox. de 19 kDa 35 în analiza SDS-PAGE (masa moleculară așteptată a IFN α 2a uman este aprox. de 18,8 kDa). Banda de proteine a fost detectată exclusiv în culturile induse cu IPTG, ceea ce denotă că expresia în ambele clone este intens controlată (a se vedea fig. 1). Analiza imunoblotului cu ajutorul unui anticorp față de IFN α 2a a confirmat că bandă de proteină supravegheată în 40 SDS-PAGE era IFN α 2a (datele nu sunt arătate). O comparație a intensităților benzilor de proteine în SDS-PAGE RHB-T7/pET26b (+).IFN α 2a și RHB-T7 Δ gor/pET2 6b(+).IFN α 2a a arătat că ambele clone exprimă proteina de interferon în cantități similare (a se vedea fig. 1).

În timpul analizei fracțiunilor proteinelor solubile și insolubile ale clonelor, s-a constatat 45 că în RHB-T7/pET26b (+).IFN α 2a, IFN α 2a recombinant este aproape complet prezent în corpusculii de incluziune. În mod contrar, în RHB-T7 Δ gor/pET26b(+).IFN α 2a, IFN α 2a produs era aproape complet solubil (a se vedea fig. 2).

Exemplul 5: Analiza expresiei IFN- β și IFN- γ

Conform metodelor descrise în Exemplele 3-4, IFN- β uman și IFN- γ uman au fost clonați 50 într-un vector de expresie pET26b(+). Plasmidele rezultate pET26b(+).IFN- β și pET26b(+).IFN- γ au fost transformate în tulpinile RHB-T7 Δ gor și RHB-T7.

Rezultatele: Similar rezultatelor observate mai sus în cazul IFN α 2a, se poate arăta că în RHB-T7 atât IFN- β uman, cât și IFN- γ uman au fost produși, în principal, în formă de corpusculi de incluziune, pe când în RHB-T7 Δ gor, cel puțin circa 90% de proteină 55 recombinantă a fost exprimată în formă solubilă (datele nu sunt arătate).

Exemplul 6: Analiza expresiei comparative a IFN α 2a

Tulpina RHB-T7 Δ gor preparată conform Exemplului 2 a fost apoi utilizată pentru a crea o tulpină dublă inactivată *trxB/gor*. Mutația inactivatoare în gena *trxB* a fost obținută esențial după cum s-a discutat mai sus în Exemplul 2 în legătură cu gena *gor*. Următorii primeri au fost utilizați pentru inactivarea genei *trxB*:

5' hatrx:

5'-

10 CACCAAGTTTGAAGACTGAGATCATTTTTGATCATATCAACAAGGTGGATCAATTA
A CCTCACTAAAGGGCGG-3' (SEQ ID NO:14);

3' hatrx:

5'-

15 GCAAGTGTATTTCGCCGTTATCGCCATTTCAGACGGAACGGACGGTTTTGCATAATA
CGA CTCACTATAGGGCTCG-3' (SEQ ID NO:15);

Tulpina rezultată a fost desemnată RHB-T7 Δ gor/*trx*. După cum s-a explicat mai sus, tulpinile dublu inactivate *trxB/gor* pot crește doar dacă ele prezintă o mutație în *ahpC**. De aceea, în RHB-T7 Δ gor/*trx* descris în prezenta invenție, mutația supresoare *ahpC** a fost atinsă prin recombinarea omologă. O asemenea mutație nu a fost necesară în tulpina RHB-T7 Δ gor.

Atat RHB-T7 Δ gor, cât și RHB-T7 Δ gor/*trx* au fost transformate cu ajutorul a 100 ng ADN pET26b(+).IFN α 2a, ceea ce a dus la obținerea tulpinilor RHB-T7 Δ gor/pET26b(+).IFN α 2a și, respectiv, RHB-T7 Δ gor/*trx*-pET26b(+).IFN α 2a.

25 În mod similar, celulele competente Origami(DE3) (Novagen) au fost transformate cu ajutorul a 100 ng ADN pET26b(+).IFN α 2a și incubate timp de o noapte la 37 °C pe plăci selective de geloză LB, fie cu 50 μ g/ml sau 150 μ g/ml kanamicină. Pe placa cu 150 μ g/ml au fost găsite 20 de colonii, în timp ce pe placa cu 50 μ g/ml au crescut \geq 500 colonii. Prepararea ADN-ului plasmidei (setul Qiagen miniprep) și dezintegrarea ulterioară de restricționare a trei clone independente luate de pe placa cu 150 μ g/ml a arătat că toate trei clone purtau vectorul de expresie pET26(+).IFN α 2a. O clonă a fost selectată pentru următoarele experimente de expresie (Origami (DE3)/pET26b(+).IFN α 2a.

Analiza de expresie și etapele ulterioare de fracționare, SDS-PAGE a proteinei recombinante IFN α 2a și de detectare imunoblot au fost efectuate conform metodelor descrise în exemplele 3-4.

40 Rezultatele: S-a observat că în toate tulpinile testate cea mai mare parte a proteinei exprimate recombinant IFN α 2a a fost produsă în fracțiunea solubilă. Doar cantități mici de proteină au fost detectate în corpusculii de incluziune. În mod interesant, cantitățile de proteină solubilă IFN- α 2a erau semnificativ mai mari în RHB-T7 Δ gor-pET26b(+).IFN α 2a în comparație cu RHB-T7 Δ gor/*trx*-pET26b (+) . IFN α 2a sau Origami (DE3)/pET26b (+).IFN α 2a. Cantitățile detectate în RHB-T7 Δ gor/*trx*-pET26b (+) . IFN α 2a erau mai mari decât în Origami (DE3) /pET26b (+).IFN α 2a (a se vedea fig. 3).

LISTA SUCCESIUNII

45 <110> Richter-Helm BioTech GmbH & Co. KG
<120> EXPRESIA RECOMBINANTĂ A INTERFERONULUI SOLUBIL
<130> P 87785
<160> 15
<170> Patent In version 3.3
<210> 1
50 <211> 166
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 1
Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
55 1 5 10 15
Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
20 25 30
Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe

MD 4384 C1 2016.06.30

35 40 45
 Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 5 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110
 10 Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 15 145 150 155 160
 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 165
 <210> 2
 <211> 187
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 25 Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 30 50 55 60
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95
 35 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 40 130 135 140
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175
 45 Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185
 <210> 3
 <211> 166
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
 20 25 30
 55 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45
 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
 50 55 60

MD 4384 C1 2016.06.30

20

<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 6
5 gtcggactta tgcccagaaa gatgttgagc aaacttatcg cttatc 46
<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial
10 <220>
<223> primer
<400> 7
tgcaaagaga ttcttggcgg agaaaccata attgcatcta ctgc 44
<210> 8
15 <211> 36
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
20 <400> 8
ggaagcgggc ctgcagcggg caccatcgaa tggcgc 36
<210> 9
<211> 36
<212> DNA
25 <213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 9
gggggggggg gtcgacggag tegtattgat ttggcg 36
30 <210> 10
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
35 <223> primer
<400> 10
tcgctatcat ctacagagaa atccggcgtt gagttcgggt tgctcagcag ctatgatcat 60
gctcgagcgg 70
40 <210> 11
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
45 <400> 11
gtaaagctc catcatgcgc ctgggtgaag accgttccat ggatgtggaa ctctgctgaa 60
gccagtacc 70
50 <210> 12
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 12
55 aacgtgctcg gtaaaaataa cgttgatgta atcaaaggct tgccccgctt aattaacct 60
cactaaaggg cgg 73
<210> 13
<211> 74
<212> DNA

```

<213> Artificial
<220>
5 <223> primer
  <400> 13
  gatcgccgt gatggttcg ccgtttacct ccagcgttt ggcatcaacg taatagact 60
  cactataggg ctcg                                     74
  <210> 14
10 <211> 73
  <212> DNA
  <213> Artificial
  <220>
  <223> primer
15 <400> 14
  caccaagtt gaaactgaga tcattttga tcatatcaac aaggaggatc aattaacct 60
  cactaaaggg cgg                                     73
  <210> 15
  <211> 74
20 <212> DNA
  <213> Artificial
  <220>
  <223> primer
  <400> 15
25 gcaagtgtat tcgccgttat cgccattcag acggaacgga cggtttgca taatagact 60
  cactataggg ctcg                                     74
  
```

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Barbara Maertens, Anne Spriestersbach, Uritza von Groll, Udo Roth, Jan Kubicek, Michael Gerrits, Marcus Graf, Michael Liss, Daniela Daubert, Ralf Wagner and Frank Schafer. Gene optimization mechanisms: A multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in Escherichia coli. Protein Sci., 2010, p. 1312-1326

(57) Revendicări:

1. Celulă gazdă pentru expresia recombinantă a unei proteine de interferon provenite de la mamifere, unde celula menționată cuprinde o genă endogenă funcțională *trxB*, o genă endogenă inactivată *gor* și o secvență de polinucleotide care codifică o proteină exogenă de interferon.
2. Celulă gazdă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** secvența de polinucleotide menționată este inclusă într-un vector de expresie.
3. Celulă gazdă conform revendicării 1 sau 2, **caracterizată prin aceea că** interferonul menționat este selectat din grupul ce constă din interferonul alfa, interferonul beta și interferonul gamma sau dintr-un fragment activ al acestora.
4. Celulă gazdă conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** proteina de interferon menționată este o proteină a interferonului uman sau un fragment biologic activ al acesteia.
5. Celulă gazdă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** proteina de interferon menționată este interferonul uman $\alpha 2a$ sau un fragment biologic activ al acestuia.
6. Celulă gazdă conform revendicărilor 1-5, **caracterizată prin aceea că** celula gazdă menționată reprezintă o celulă bacteriană.
7. Celulă gazdă conform revendicării 6, **caracterizată prin aceea că** celula bacteriană menționată reprezintă o celulă de *Escherichia coli*.
8. Celulă gazdă conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** celula bacteriană menționată de *Escherichia coli* a fost obținută din tulpina BL21*Escherichia coli*.
9. Celulă gazdă conform revendicărilor 1-8, **caracterizată prin aceea că** celula bacteriană menționată cuprinde gena polimerazei T7 ARN.
10. Celulă gazdă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** gena polimerazei T7 ARN este inserată în genomul celulei gazdă.
11. Procedeu de expresie recombinantă a unui interferon solubil într-o celulă gazdă ce cuprinde:
 - (a) oferirea unei celule gazdă conform oricărei dintre revendicările 1-10;
 - (b) cultivarea celulei gazdă în condiții ce permit expresia proteinei de interferon;
 - (c) obținerea proteinei solubile de interferon din celula gazdă.
12. Procedeu conform revendicării 11, **caracterizat prin aceea că** etapa (c) cuprinde dezagregarea celulelor gazdă.
13. Procedeu conform revendicării 12, **caracterizat prin aceea că** etapa (c) cuprinde suplimentar purificarea proteinei prin cromatografie.
14. Utilizarea unei celule gazdă conform oricărei dintre revendicările 1-10 pentru expresia recombinantă a unui interferon solubil.

Șef adjunct Direcție Brevete:

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

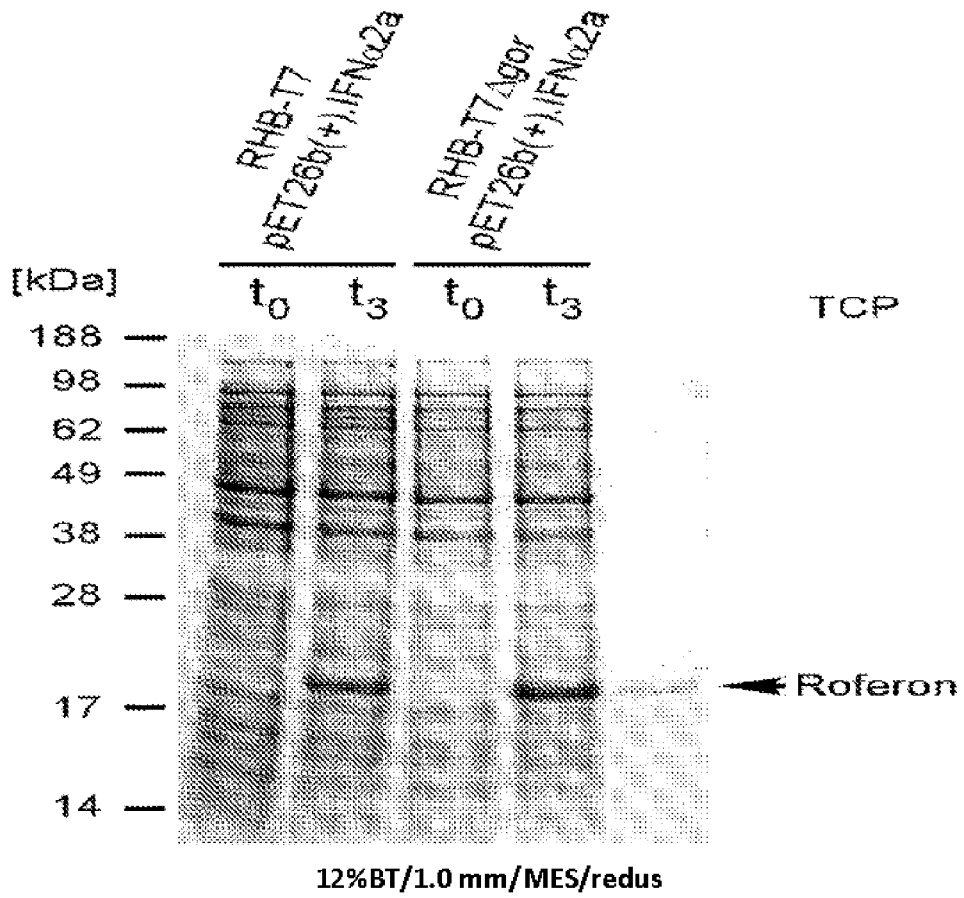


Fig. 1

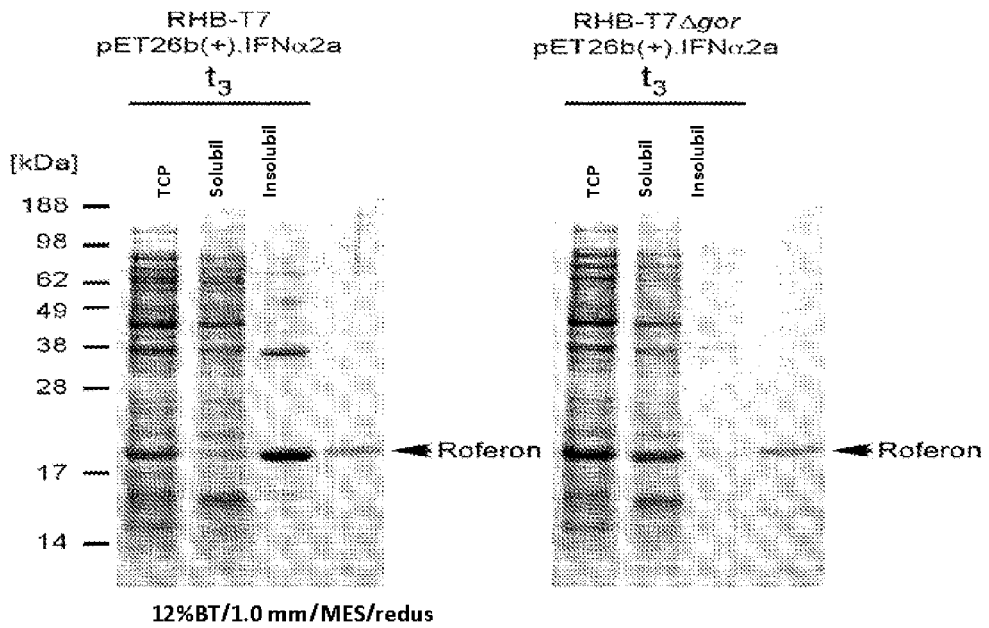


Fig. 2

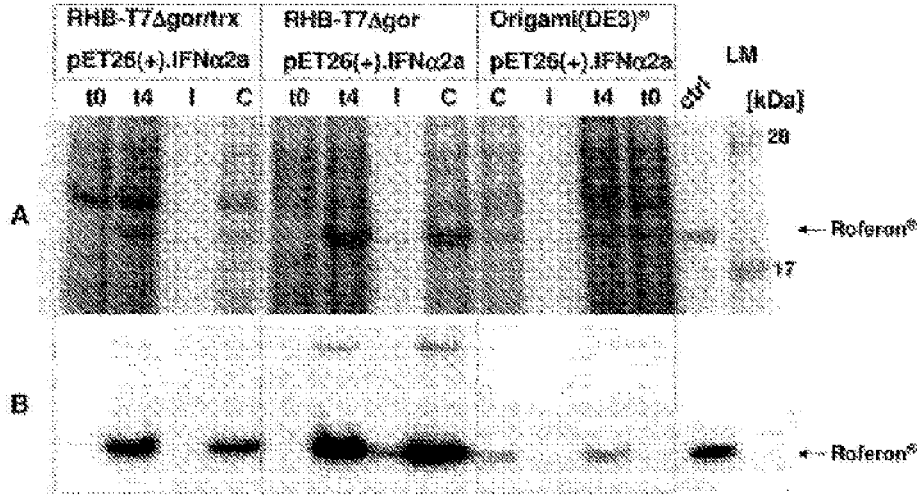


Fig. 3

```

atgtggagtc tgcgcagac ccctagccctg ggcagccgic gtaccctgat gctgctggcc 60
cagatgcgta aaattagcct gtttagctgc ctgaaagatc gtcattgattt tggctttcog 120
caggaagaat ttggcaacca gtttcagaaa gcggaacca ttccggtgct gcatgaaatg 180
attcagcaga tottcaacct gtttagcacc aaagatagca gdcggcgtg ggatgaaacc 240
ctgctggata aattctatac cgaactgtat cagcagctga acgatctgga agcgtgcgtg 300
attcagggcg tgggctgac cgaaaccccg ctgatgaaag aagatagcat tctggccgtg 360
cgtaastatt ttcagcgcct caccctgtat ctgaaagaaa aaaaatateg cccgtgcgog 420
tgggaagtgg tgcgtgcgga aattatggct agctttagcc tgagcaccaa cctgcaggaa 480
agcctgcgta gcaagaata ataa
    
```

Fig. 4

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2013 0099 (32) Data de prioritate recunoscută: 2011.05.26
 (22) Data depozit: 2012.05.21 Raport de documentare internațională: da
 (71) Solicitant: **RICHTER-HELM BIOTEC GMBH & CO. KG, DE**
 (54) Titlul: **Expresia recombinantă a interferonului solubil**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “*gor* genă”, “*trxB* genă”, “*gor* genă+*E.coli*”, “interferon uman $\alpha 2a$ ”
Int.Cl: *C12N 1/21* (2006.01), *C07K 14/555* (2006.01), *C12N 9/02* (2006.01), *C12N 9/00* (2006.01)

"Worldwide" (Espacenet): “*gor* gene”, “*trxB* gene”, “*gor* gene+*E.coli*”, “human interferon $\alpha 2a$ ”
Int.Cl: *C12N 1/21* (2006.01), *C07K 14/555* (2006.01), *C12N 9/02* (2006.01), *C12N 9/00* (2006.01)

EA, CIS (Eapatis): “*gor* ген”, “*trxB* ген”, “*gor* ген+*E.coli*”, “человеческий интерферон $\alpha 2a$ ”
Int.Cl: *C12N 1/21* (2006.01), *C07K 14/555* (2006.01), *C12N 9/02* (2006.01), *C12N 9/00* (2006.01)

SU (nonpublic): “*gor* genă”, “*trxB* genă”, “*gor* genă+*E.coli*”, “interferon uman $\alpha 2a$ ”
Int.Cl: *C12N 1/21* (2006.01), *C07K 14/555* (2006.01), *C12N 9/02* (2006.01), *C12N 9/00* (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

Toru Tanaka, Fumihito Hosoi, Yuko Yamaguchi-Iwai, Hajime Nakamura, Hiroshi Masutani, Shugo Ueda, Akira Nishiyama, Shunichi Takeda, Hiromi Wada, Giannis Spyrou, and Junji Yodoi. Thioredoxin-2 (*TRX-2*) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis EMBO J., 2002, 21(7), p. 1695–1703.

Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. Curr Protoc Mol Biol. 2001 May;Chapter 16:Unit16.2. doi: 10.1002/0471142727.mb1602s11.

Kim BC, Kim K, Park EH, Lim CJ. Nucleotide sequence and revised map location of the *arn* gene from bacteriophage T4. Mol Cells. 1997 Oct 31;7(5):694-6.

Russel M, Model P. Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. J Biol Chem. 1988, 263(18), p. 9015-9019.

Markiv A, Beatson R, Burchell J, Durvasula RV, Kang AS. Expression of recombinant multi-coloured fluorescent antibodies in *gor* -/*trxB*- *E. coli* cytoplasm. BMC Biotechnol. 2011, 11, 117.

doi: 10.1186/1472-6750-11-117.
<https://www.wikigenes.org/e/gene/e/41737.html>

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	M Becker-Hapak et al. Role of rpoS in the regulation of glutathione oxidoreductase (gor) in Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters, vol. 134, nr.1, p. 39-44	1,7-11
A	Smirnova G.V. Effects of Cystine and Hydrogen peroxide on Glutathione Status and Expression of antioxidant genes in Escherichia coli. Biochemistry, Kluwer Academic Publishers, 2005, vol. 70, nr. 8, p. 926-934	1,7-11
A	EP 2000480 A1 2008.12.10	1-14
A	US 2006246541 A1 2006.11.02	1-14
A	Hatahet Feras. Disruption of reducing pathways is not essential for efficient disulfide bond formation in the cytoplasm of E.coli. Microbial cell factories, vol. 9, 67	1-14
A	Bessette P.H. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. Proceedings of the National Academy of Sciences, National Academy of Sciences, vol. 96, nr.24, p. 13703-13708	1-14
A	CN 101225398 A 2008.07.23	1-14
A	CN 102978276 A 2013.03.20	1-14
A	JP 2004290003 A 2004.10.21	1-14
A	CN 101921330 A 2010.12.22	1-14
A	US 5510472 A 1996.04.23	1-14
A	US 5554514 A 1996.09.10	1-14
A, D, C	Barbara Maertens, Anne Spriestersbach, Uritza von Groll, Udo Roth, Jan Kubicek, Michael Gerrits, Marcus Graf, Michael Liss, Daniela Daubert, Ralf Wagner and Frank Schdfer. Gene optimization mechanisms: A multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in Escherichia coli. Protein Sci., 2010, p. 1312-1326.	1-14

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când	D – document menționat în descrierea cererii de brevet

documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	25.06.2015
Examinator	LUPAȘCU Lucian