

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-2639**
(22) Přihlášeno: **19.07.2001**
(30) Právo přednosti: **25.07.2000 DE 10036491**
(40) Zveřejněno: **13.03.2002**
(Věstník č. 3/2002)
(47) Uděleno: **01.06.2011**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **13.07.2011**
(Věstník č. 28/2011)

(11) Číslo dokumentu:

302 558

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/69 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12R 1/78 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

EP 0955369; EP 0586892; EP 1176205.

Manes a kol. (1998) J. Biol. Chem. 273, 23353-60; Batard a kol. (2000) Arch. Biochem. Biophys. 379, 161-9; Sreekrishna a kol. (1997) Gene 190, 55-62.

(73) Majitel patentu.

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH

(72) Původce:

Mueller Rainer Dr., Penzberg, DE
Thalhofer Johann-Peter Dr., Weilheim, DE
Geipel Frank Dr., Penzberg, DE
Hoelke Werner Dr., Penzberg, DE
Glaser Stephan Dr., Seeshaupt, DE
Eckstein Hellmut, Weilheim, DE
Kirschbaum Thomas Dr., München, DE
Bommarius Bettina Dr., Atlanta, GA, US

(74) Zástupce:

Dr. Karel Čermák, Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Způsob produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v kvasinkových buňkách

(57) Anotace:

Způsob produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v kvasinkových buňkách zahrnující kroky: a) klonování genové sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy do různých vektorů, b) transformace kvasinek vektory, c) exprese a d) purifikace alkalické fosfatázy. Při tomto způsobu i) první vektor má gen rezistence pro první selekční marker, ii) transformanty, které integrovaly gen rezistence a genovou sekvenci do genomu se vybírají růstem na živném médiu obsahujícím nízkou koncentraci prvního selekčního markeru, iii) počet kopií genu v buňkách se zvýší několikanásobnou transformací prvním vektorem, přičemž několikanásobné transformanty se vybírají růstem na živném médiu při zvýšeném selekčním tlaku, iv) přidá se druhý vektor, který má gen rezistence pro druhý selekční marker, v) počet kopií genu v buňkách se zvýší několikanásobnou transformací druhým vektorem, přičemž několikanásobné transformanty se vybírají růstem na živném médiu při zvýšeném selekčním tlaku a vi) vyberou se pouze ty klony, které do genomu stabilně integrovaly několik kopií genové sekvence a geny rezistence pro selekční markery.

CZ 302558 B6

Způsob produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v kvasinkových buňkách

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v kvasinkových buňkách. Tento způsob zahrnuje kroky: a) klonování genové sekvence do různých vektorů, b) transformace kvasinek, c) exprese a d) purifikace alkalické fosfatázy. Získaná fosfatáza má specifickou aktivitu větší než 3000 U/mg.

Dosavadní stav techniky

Alkalické fosfatázy (AP) jsou dimerní, zinek obsahující nespecifické fosfomonoesterázy, které se vyskytují v prokaryotických, a také v eukaryotických organismech, např. v *E. coli* a savcích (McComb et al., Alkaline Phosphatases, Plenum Press, New York, 1979). Srovnání primárních struktur různých alkalických fosfatáz ukázalo vysoký stupeň homologie (25 až 30 % homologie AP mezi *E. coli* a savci, Millán, Anticancer Res. 8, 995 až 1004, 1988, Harris, Clin. Chim. Acta, 186, 133 až 150, 1989).

U lidí a vyšších živočichů obsahuje rodina AP čtyři členy, které jsou lokalizovány v různých genových lokusech (Millán, Anticancer Res., 8, 995 až 1004, 1988, Harris, Clin. Chim. Acta, 186, 133 až 150, 1989). Rodina alkalické fosfatázy zahrnuje tkáňově specifická AP (placentární AP (PLAP), AP zárodečné linie (GCAP) a intestinální AP (IAP)) a tkáňově nespecifické AP (TnAP), které jsou primárně lokalizovány v játrech, ledvinách a kostech.

Rozhodující vlastnosti doposud známých AP je velká variabilita katalytické aktivity savčí AP, která má 10 až 100 krát vyšší hodnotu K_{cat} , než AP *E. coli*. Ze savčích AP projevuje nejvyšší specifickou aktivitu boviní intestinální AP (bIAP). Tato vlastnost činí bIAP atraktivní pro biochemické aplikace, jako je například použití odpovídajících enzymových konjugátů jako diagnostické reagentie nebo pro defosforylaci DNA. Je popsán výskyt různých boviních intestinálních alkalických fosfatáz, které mají různě velikou specifickou aktivitu v EP 0 955 369 a v práci Manes et al. (J. Biol. Chem., 273, č. 36, 23353 až 23360, 1998). Doposud byla popsána rekombinantní exprese eukaryotických alkalických fosfatáz s nízkou aktivitou (do 3000 U/mg) v různých eukaryotických buněčných liniích, jako jsou například buňky CHO (bIAP I/WO 93/18139, Weissig et al., Biochem. J., 260, 503 až 508, 1993), buňky COS (lidská placentární AP/Berger et al., Biochemistry, 84, 4885 až 4889, 1987) nebo bakulovirové expresní systémy (lidská placentární AP/Davis et al., Biotechnology, 10, 1149 až 1150, 1992). Byla také popsána exprese aktivnějších boviních intestinálních AP (specifická aktivita > 3000 U/mg) v buňkách CHO (bIAP, II, III a IV/Manes et al., J. Biol. Chem., 273, č. 36, 23353 až 23360, 1998). Ale nevýhodou exprese alkalické fosfatázy v těchto expresních systémech je nízký výtěžek exprese, který činí rekombinantní produkci obzvláště vysoce aktivní AP neekonomickou.

Ačkoliv je v principu možné exprimovat eukaryotické alkalické fosfatázy v prokaryotických expresních hostitelích, jako je například *E. coli* (lidská placentární AP/Beck a Burtscher, Protein Expression a Purification, 5, 192 až 197, 1994), alkalické fosfatázy exprimované v prokaryotech nejsou glykosylovány, což je esenciální zejména pro přípravu enzymových konjugátů.

Podstata vynálezu

V důsledku toho je cílem předkládaného vynálezu vyvinout robustní a stabilní expresní systém pro produkci glykosylovaných eukaryotických alkalických fosfatáz, které mají vysokou specifickou aktivitu, což díky vysokému výtěžku exprese umožňuje ekonomickou produkci takové alkalické fosfatázy a navíc poskytuje enzym, jehož vlastnosti jsou srovnatelné s nativní alkalickou

fosfatázou s vysokou nebo nízkou aktivitou (komerčně dostupná například od firmy Roche Diagnostics GmbH, Biozyme, Oriental Yeast), co se týče například specifické aktivity a tepelné stability.

5 Předmětem vynálezu je způsob produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v kvasinkových buňkách, jehož podstata spočívá v tom, že se

I) a₁) genová sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy klonuje do prvního vektoru majícího gen rezistence pro první selekční marker;

10 a₂) genová sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy se klonuje do druhého vektoru majícího gen rezistence pro druhý selekční marker;

přičemž první selekční marker se liší od druhého selekčního markeru;

15 b) kvasinkové buňky se transformují prvním vektorem z kroku a₁) a transformanty, které integrovaly gen rezistence pro první selekční marker a genovou sekvenci eukaryotické alkalické fosfatázy do genomu se vybírají růstem na živném médiu obsahujícím nízkou koncentraci prvního selekčního markeru,

20 c) počet kopií genu v buňkách získaných v kroku b) se zvýší několikanásobnou transformací prvním vektorem, přičemž několikanásobné transformanty se vybírají růstem na živném médiu při zvýšeném selekčním tlaku,

25 d) několikanásobné transformanty z kroku c) se transformují druhým vektorem z kroku a₂) a transformanty, které integrovaly gen rezistence pro druhý selekční marker a genovou sekvenci eukaryotické alkalické fosfatázy do genomu se vybírají růstem na živném médiu obsahujícím nízkou koncentraci druhého selekčního markeru,

30 e) počet kopií genu v buňkách získaných v kroku d) se zvýší několikanásobnou transformací druhým vektorem, přičemž několikanásobné transformanty se vybírají růstem na živném médiu při zvýšeném selekčním tlaku,

f) vyberou se ty klony, které do genomu stabilně integrovaly několik kopií genové sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy a geny rezistence pro selekční markery;

35 II) v klonech z kroku I)f) se exprimuje genová sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy; a

III) alkalická fosfatáza získaná z kroku II) se purifikuje.

Ve výhodných provedeních tohoto způsobu

40 – použitá genová sekvence odpovídá sekv. id. č. 1 nebo sekv. id. č. 5; a

– používá se methylotrofních kvasinek, zejména kvasinkového kmene *Pichia pastoris* nebo *Hansenula polymorpha*.

45 Výhodná genová sekvence je DNA sekvence, která kóduje eukaryotickou alkalickou fosfatázou, která má specifickou aktivitu větší než 3000 U/mg a ve speciálních případech větší než 7000 U/mg až přibližně 10 000 U/mg. Například bylo prokázáno, že podle vynálezu je vyhovující DNA sekvence podle sekv.id.č.1. Obzvláště je výhodná DNA sekvence s optimalizovanými kodony, která odpovídá genové sekvenci sekv. id. č. 1 na úrovni aminokyselin. Optimalizace kodonů znamená, že každý kodon například ze sekv. id. č. 1 byl optimalizován umlčenými mutacemi, tj. změnami na úrovni DNA, které ale nemají žádný účinek na aminokyselinové úrovni, aby se zvýšila translace podle požadavků vybraného expresního hostitele, což má za následek například vznik genové sekvence podle sekv. id. č. 5. Ale do vektoru je také možné zavést jiné sek-

50

vence než sekv. id. č. 1, které kódují alkalické fosfatázy a jsou volitelně s optimalizovanými kodony, jako je například bIAPI, III, IV (DE 198 19 962 a EP 0 955 369). Pro způsob podle vynálezu je obzvláště výhodné použít genovou sekvenci s optimalizovanými kodony podle sekv. id. č. 5. Odpovídající genová sekvence je pak klonována do jednoho vektoru nebo několika vektorů, které pak jsou vybírány v závislosti na transformovaném hostiteli.

Methylotrofické kvasinky, např. *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, a také další kvasinky, jako je například *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* nebo *Schizosaccharomyces pombe*, jsou obzvláště vhodné jako kvasinkový hostitel. Odborníkovi jsou známy vhodné vektory, jako jsou například pPCTαA, pLIC9K, vektory Yes, pTEF1/Zeo, pYDI (např. Invitrogen). Expresní vektor, který je takto vytvořen, je výhodně transformován do různých kmenů *Pichia pastoris* a stabilně integrován do genomu. Stabilní integrace do kvasinkového genomu má výhodu, že během následné produkce například eukaryotické vysoce aktivní alkalické fosfatázy ve velkoobjemových fermentech není vyžadován selekční tlak. Stabilní integrace do genomu znamená, že expresní vektor je zaveden do genomu například *Pichia pastoris* prostřednictvím homologní rekombinace a je tedy dědičně přenášen jako permanentní složka z generace na generaci (Cregg, J. M. et al., Mol. Cell. Biol., 5, 3376 až 3385, 1985).

V methylotrofických kvasinkách byl počet kopií genu zvýšen mnohonásobnou transformací za současného zvyšování selekčního tlaku vhodným selekčním markerem, např. antibiotikem, jako je například Zeocin[®] nebo Genticin (G418) nebo auxotrofním markerem, ve kterém mohou přežít pouze ty klony, které integrovaly stabilně několik kopií expresního vektoru do genomu. Aby byly rezistentní na vyšší koncentrace antibiotika použitého jako selekční marker, je nutné, aby klony produkovaly stoupající množství proteinu. To může být dosaženo například mnohonásobnou integrací expresního vektoru, který obsahuje gen rezistence na antibiotikum použité jako selekční marker navíc k expresní kazetě pro vysoce aktivní alkalickou fosfatázu.

Cíle ekonomické produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v robustním a stabilním expresním systému s vysokým výtěžkem exprese nemůže být dosaženo, dokud nebudou kombinována opatření (a) až (f). Tudíž například transformace kmenu X-33 *Pichia pastoris* expresním vektorem, který obsahuje gen bIAPII podle sekv. id. č. 1, nevede bez těchto opatření k žádoucímu výsledku (viz příklady 1 a 2). Ačkoliv tento proces umožnil významné zvýšení výtěžku exprese ve srovnání s expresí bIAPII v buňkách CHO (Manes et al., J. Biol. Chem., 273, č. 36, 23353 až 23360, 1998), neposkytl ekonomickou produkci rekombinantní alkalické fosfatázy.

Jedno z nezbytných opatření způsobu podle vynálezu je syntéza genové sekvence s optimalizovanými kodony. Kompletní syntéza *de novo* genu dlouhého přibližně 1,5 kb, který kóduje eukaryotickou vysoce aktivní alkalickou fosfatázu, byla nezbytná, aby se optimalizoval každý kodon pro expresi v kvasinkách. Bylo možné optimalizovat každý kodon, jak bylo vyžadováno, retranslací aminokyselinové sekvence eukaryotické vysoce aktivní alkalické fosfatázy podle sekv. id. č. 4 (bIAPII) a s použitím degenerovaného kódu. Za tímto účelem byl gen rozdělen na 28 oligonukleotidů, které byly dlouhé 54 až 82 nukleotidů. Oligonukleotidy byly navrženy jako střídavé sekvence fragmentů 5' a 3' konců sense vlákna a antisense vlákna, které se komplementárně překrývaly se sousedními oligonukleotidy. Překrývající se úsek byl pokaždé vybrán tak, aby bylo velkou měrou zabráněno nespecifické vazbě v průběhu nasedání primerů v následné reakci PCR. Oligonukleotidy na 5' a 3' koncích genu byly opatřeny místy rozpoznávání pro restrikční endonukleázy v protisměru a po směru od kódující oblasti, které mohly být použity pro pozdější inzerci syntetického genu podle sekv. id. č. 5 do expresních vektorů. Tedy v protisměru bylo zavedeno místo rozpoznávání pro restrikční endonukleázu EcoRI a po směru bylo zavedeno místo rozpoznávání pro restrikční endonukleázu Asp718. Sekvence oligonukleotidů jsou ukázány v sekv. id. č. 6 až 33.

Syntéza genu byla prováděna prostřednictvím reakce PCR. Za tímto účelem byla kódující oblast nejdříve rozdělena na tři segmenty (oligonukleotidy 6 až 15, 16 až 23, 24 až 33) a tyto segmenty byly vytvářeny v oddělených reakcích PCR. Během syntézy genu pomocí reakce PCR s použitím

překrývajících se komplementárních oligonukleotidů je genový fragment po krocích prodlužován za vzniku kompletního produktu, který je pak amplifikován v dalších cyklech. Teplota pro nasedání primerů v tomto procesu závisí na překrývajícím se úseku s nejnižší teplotou tání.

5 Tři segmenty pak byly analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu, produkty, které měly očekávanou délku, byly izolovány z gelu pomocí soupravy pro extrakci z gelu QIAquick gel extraction kit (Qiagen) a syntetizovány v další reakci PCR, aby vznikl kompletní genový produkt. V tomto procesu byla reakce PCR prováděna v prvních 5 cyklech bez přidání primerů na 5' konci a na 3' konci celého genu, takže zpočátku bylo z těchto tří segmentů vytvořeno pouze několik
10 fragmentů genového produktu, který měl očekávanou délku. Teplota pro nasedání primerů závisela na překrývajícím se úseku s nejnižší teplotou tání. Pak byly přidány koncové primery a teplota pro nasedání primerů byla zvýšena tak, aby odpovídala teplotě pro nasedání primerů toho primeru, který měl nejnižší teplotou tání. Genový fragment, který měl očekávanou délku, byl silně amplifikován v dalších 25 cyklech.

15 PCR směs byla analyzována elektroforézou na agarózovém gelu a byl izolován genový fragment mající očekávanou délku (QIAquick gel extraction kit/Qiagen).

20 Klonování tohoto PCR fragmentu, transformace do *Pichia pastoris* a exprese je popsána v příkladu 3.

Gen vysoce aktivní alkalické fosfatázy s optimalizovanými kodony umožnil, že výtěžek exprese byl zvýšen třikrát ve srovnání s prvními experimenty s genem divokého typu.

25 Avšak tyto klony neposkytly ekonomický způsob produkce vysoce aktivní alkalické fosfatázy.

Jedno opatření, které může zvýšit výtěžek exprese heterologních a homologních proteinů v *Pichia pastoris*, je zvýšení počtu kopií genu v buňce mnohonásobnou transformací. Toto opatření může zmnožit transkripční produkt, tj. mRNA cílového genu. Počet kopií genu je zvýšen
30 mnohonásobnou transformací klonu obsahujícího expresní vektor při současně stoupajícím selekčním tlaku během následujícího růstu transformantů na živných miskách obsahujících zvýšené koncentrace antibiotika použitého jako selekční marker. Při tomto postupu je expresní klon, který již přijal alespoň jednu kopii expresního vektoru z prvního transformačního cyklu, opět učiněn kompetentním (viz příklad 1) a je znovu transformován expresním vektorem. Jsou vybírány transformanty, které integrovaly několik kopií expresního vektoru do genomu, nanesením na
35 živné misky s vyšším selekčním tlakem, tj. misky obsahují vyšší koncentraci antibiotika (např. Zeocin[®]) použitého jako selekční marker během prvního transformačního cyklu. Pro tento účel je zjištěna nejvyšší koncentrace antibiotika použitého jako selekční marker, ve které klon z prvního transformačního cyklu ještě roste, a koncentrace antibiotika použitého jako selekční marker je
40 zvýšena podle výše určené prahové hodnoty pro misky s YPDS agarem pro další transformaci. Zvýšení počtu kopií expresního vektoru také zvyšuje počet kopií genu rezistence, který je složkou expresního vektoru, a tedy také zvyšuje rezistenci na vyšší koncentraci antibiotika použitého jako selekční marker. Je také možné vybírat klony obsahující různý počet kopií expresního vektoru v genomu změnami koncentrace antibiotika použitého jako selekční marker na živných mis-
45 kách (přibližně 100 až 2000 µg/ml/ viz příklad 4).

Další opatření, které může být použito pro zvýšení výtěžku exprese heterologních a homologních proteinů v kvasinkách, jako je například *Pichia pastoris*, je zvýšení počtu kopií genu mnohonásobnou selekcí. Aby se toho dosáhlo, je expresní klon, který již byl optimalizován mnoho-
50 násobnou transformací expresním vektorem obsahujícím expresní kazetu s cílovým genem (např. gen, který kóduje vysoce aktivní alkalickou fosfatázu podle sekv. id. č. 5) a gen rezistence pro první antibiotikum použité jako selekční marker (např. Zeocine[®]), transformován druhým expresním vektorem, který obsahuje cílový gen (např. gen, který kóduje vysoce aktivní alkalickou fosfatázu podle sekv. id. č. 5) a gen rezistence pro druhé antibiotikum (např. Gentamicin (G418)
55 použité jako selekční marker. Když jsou pak transformanty naneseny na živné misky, které obsa-

hují druhé antibiotikum jako selekční marker, jsou vybrány pouze ty klony, které přijaly také alespoň jednu kopii expresního vektoru obsahujícího gen rezistence pro druhé antibiotikum použité jako selekční marker navíc ke kopii expresního vektoru obsahujícího gen rezistence pro první antibiotikum použité jako selekční marker. Tyto expresní klony mohou být nyní dále podrobeny další mnohonásobné transformaci expresním vektorem obsahujícím gen rezistence pro druhé antibiotikum použité jako selekční marker (viz příklad 5).

Kombinací mnohonásobné transformace a dvojité selekce bylo možné zvýšit výtěžek exprese čtyřikrát ve srovnání s výtěžkem exprese klonů obsahujících gen s optimalizovanými kodony z prvního transformačního cyklu.

Rekombinantní alkalická fosfatáza může být extrahována z biomasy metodami extrakce, které jsou v principu odborníkovi známy (např. Protein Purification, Springer Verlag, editor Robert Scopes, 1982). Pás s čistým produktem, který má specifickou aktivitu větší než 7000 U/mg je získán metodami chromatografické separace a zejména metodami používajícími v koloně hydrofobní materiál a výměník kationtů.

Purifikovaný produkt byl podroben N-koncovému sekvencování, aby se charakterizovala rekombinantní vysoce aktivní alkalická fosfatáza.

Byla vymezena dominantní sekvence EAEAEFLIPA (sekv. id. č. 36). Sekvence nepochybně koreluje s N-koncovou sekvencí AP“LIPA“ (sekv. id. č. 37) a se spojovacím peptidovým konstruktem EAEAEF (sekv. id. č. 38), který je vytvořen strategií klonování genové sekvence do vektoru a štěpením signálního peptidu α -faktoru signální peptidázou Kex2 (např. Invitrogen).

Byla zkoumána stabilita rekombinantního produktu alkalické fosfatázy ve srovnání s přirozeně se vyskytující alkalickou fosfatázou. Když byly roztoky podrobeny tepelnému stresu (55 °C), poskytl vzorky srovnatelné výsledky.

Proto předkládaný vynález popisuje poprvé způsob, který umožňuje ekonomickou produkci rekombinantní alkalické fosfatázy ze savčích buněk, jako jsou například bovinní intestinální buňky, která má vlastnosti srovnatelné s nativní vysoce aktivní bovinní intestinální alkalickou fosfatázou a je glykosylována.

Předkládaný vynález se také týká DNA sekvence podle sekv. id. č. 5 jako genové sekvence s optimalizovanými kodony pro expresi genu pro vysoce aktivní alkalickou fosfatázu v *Pichia pastoris*.

Dalším předmětem vynálezu je vektor obsahující sekv. id. č. 5 a obzvláště výhodně vektor pHAP10-3 podle obr. 2. pHAP10-3 je vektor pPICZ α A, který je komerčně dostupný (Invitrogen), a obsahuje gen podle vynálezu podle sekv. id. č. 5, který je pod kontrolou promotoru AOX 1.

Dalším předmětem vynálezu je hostitelský kmen, který byl transformován vektory podle vynálezu. Obzvláště výhodný je kmen X-33 *Pichia pastoris* transformovaný vektorem pHAP10-3.

Dalším výhodným vektorem je vektor, který obsahuje celou expresní kazetu z pHAP10-3, která v podstatě obsahuje promotor AOX 1, signální peptid α -faktoru ze *Saccharomyces cerevisiae*, který je klonován do správného čtecího rámce za signální peptid, cílový gen s optimalizovanými kodony podle sekv. id. č. 5, který kóduje vysoce aktivní alkalickou fosfatázu, a úsek terminace transkripce AOX 1 (viz obr. 3). Obzvláště výhodný je vektor pHAP 10-3/9K, který obsahuje komerčně dostupný vektor pPIC9K (Invitrogen) a expresní kazetu z pHAP 10-3 včetně syntetického genu podle sekv. id. č. 5.

Vektory pHAP 10-3 a pHAP 10-3/9K jsou stejně významné, protože výsledný produkční klon obsahuje kopie obou vektorů.

Dalším předmětem vynálezu je hostitelský kmen, který byl transformován vektorem pHAP10-3/9K. Ale v kontextu předkládaného vynálezu jsou také vhodné další vektory a kmeny odborníkovi známe, jako jsou například vektory YES, pYD1, pTEF 1/ZEO (Invitrogen) a *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorfa*, *Yarrowia lipolytica* a obzvláště *Pichia pastoris* X-33. Kmen X-33 *Pichia pastoris* transformovaný vektorem pHAP10-3/9K je pro vynález obzvláště výhodný.

Proto dalším předmětem vynálezu je způsob produkce eukaryotické vysoce aktivní alkalické fosfatázy exprese proteinu v hostitelském kmeni, který byl transformován jedním nebo několika vektory podle vynálezu a obzvláště vektorem pHAP 10-3 nebo vektorem pHAP 10/3/9K. Kmeny *Pichia pastoris*, které byly transformovány vynálezeckými vektory, jsou pro vynálezecký způsob obzvláště výhodné. V této souvislosti je zejména výhodný kmen X-33 *Pichia pastoris*, který byl transformován vektorem pHAP 10-3 a pHAP 10-3/9K.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1

Plazmidová mapa expresního vektoru pHAP-I obsahujícího gen bIAPII v pPICZαA (Invitrogen).

Obrázek 2

Plazmidová mapa expresního vektoru pHAP 10-3 obsahujícího syntetický gen v pPIC9K (Invitrogen).

Obrázek 3

Plazmidová mapa expresního vektoru pHAP 10-3/9K obsahující syntetický gen v pPIC9K (Invitrogen).

Zkratky

YPD: médium s dextrózou a s kvasinkovým peptonem

YPDS: médium s dextrózou, sorbitolem a s kvasinkovým peptonem

BMGY: pufrované komplexní médium s glycerolem

BMMY: pufrované komplexní médium s methanolem

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Klonování genu bIAPII

Gen bIAPII podle sekv. id. č. 1 (EP 0 955 369, Manes et al., J. Biol. Chem., 273, č. 36, 23353 až 23360, 1998) byl nejdříve v protisměru a po směru opatřen místy pro štěpení restrikční endonukleázou vhodnými pro klonování do expresních vektorů pro *Pichia pastoris* pomocí PCR a selekcí vhodných primerů podle sekv. id. č. 2 a 3. Z tohoto důvodu bylo místo pro štěpení restrikční endonukleázou EcoRI připojeno v protisměru a místo pro štěpení restrikční endonukleázou AspI78 I bylo připojeno po směru.

PCR fragment byl znovu štěpen EcoRI a Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH), znovu izolován (QIAquick gel extraction kit/Qiagen), a pak ligován do vektorového fragmentu expresního vektoru pPICZαA (Invitrogen), který byl linearizován EcoRI a Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH) a izolován (QIAquick gel extraction kit/Qiagen). V tomto vektoru je gen bIAPII pod kontrolou promotoru AOX 1 (promotor pro alkoholoxidázu 1 z *Pichia pastoris* a indukovatelný methanolem) a je klonován do správného čtecího rámce za signální peptid α-faktoru ze *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocí restrikční analýzy a sekvencováním pak bylo vyšetřováno, zda takto vložený genový fragment byl bez chyb. Expresní vektor takto vytvořený, který obsahuje gen bIAPII, který kóduje eukaryotickou vysoce aktivní alkalickou fosfatázu, byl nazván pHAP-1 (viz obr. 1).

Transformace pHAP-1 v *Pichia pastoris*

Pro transformaci pHAP-1 v *Pichia pastoris* X-33 a následnou integraci do genomu byl vektor nejdříve linearizován SacI (Roche Diagnostics GmbH). Transformace byla prováděna prostřednictvím elektroporace s použitím přístroje Gene Pulser II (Biorad).

Pro tento účel bylo 5 ml média YPD (Invitrogen) inokulováno kolonií kmene divokého typu *Pichia pastoris* a inkubováno přes noc za třepání ve 30 °C. 200 ml čerstvého média YPD (Invitrogen) pak bylo inokulováno přenosem v poměru 1:2000 kulturou pěstovanou přes noc a inkubováno přes noc za třepání ve 30 °C, dokud OD₆₀₀ nedosáhla hodnoty 1,3 až 1,5. Buňky byly stočeny (1500 x g/5 minut) a pelet byl resuspendován ve 200 ml ledově chladné sterilní vody (0 °C). Buňky byly opět stočeny (1500 x g/5 minut) a resuspendovány ve 100 ml ledově chladné sterilní vody (0 °C). Buňky byly opět stočeny a resuspendovány v 10 ml ledově chladného (0 °C) 1M sorbitolu (ICN). Buňky byly opět stočeny a resuspendovány v 0,5 ml ledově chladného (0 °C) 1M sorbitolu (ICN). Buňky takto získané byly drženy na ledu a okamžitě použity pro transformaci.

Přibližně 1 µg DNA linearizovaného vektoru pHAP-1 bylo přidáno k 80 µl buněk a celá směs byla přenesena do ledově chladné (0 °C) elektroporační kyvety a inkubována dalších 5 minut na ledu. Pak byla kyveta přenesena do přístroje Gene Pulser II (Biorad) a byla prováděna transformace při nastavení parametrů 1 kV, 1 kΩ a 25 µF. Po elektroporaci byl ke směsi přidán 1 ml 1M sorbitolu (ICN) a následně bylo nanášeno 100 až 150 µl na YPDS misku s agarem (Invitrogen) obsahujícím 100 µg/ml Zeocinu^(R) (Invitrogen). Misky pak byly inkubovány při 30 °C po dobu 2 až 4 dnů.

Misky s médiem Raster MD (= minimální dextróza) byly naočkovány klony a byly dále analyzovány. Rostoucí klony byly vybrány, resuspendovány ve 20 µl sterilní vody, lyzovány 17,5 U lytiskázy (Roche Diagnostics GmbH) (1 hodina, 37 °C) a přímo vyšetřeny na správnou integraci bIAPII expresní kazety pomocí PCR.

Klony, které integrovaly kompletní expresní kazetu během transformace do genomu, pak byly použity v expresních experimentech.

Expres vysoce aktivní alkalické fosfatázy

3 ml média BMGY (Invitrogen) bylo inokulováno pozitivními klony a inkubováno přes noc za třepání ve 30 °C. Pak byla určována OD v 600 nm a 10 ml média GMMY (Invitrogen) bylo inokulováno přenosem tak, aby byla získána OD₆₀₀ rovna 1. Médium BMMY (Invitrogen) obsahuje methanol (Mallinckrodt Baker B.V.), který indukuje expresi vysoce aktivní alkalické fosfatázy přes promotor AOX 1.

Třepací láhve byly inkubovány za třepání při 30 °C, vzorky byly odebírány každých 24 hodin, byla zjišťována OD₆₀₀, byl prováděn test aktivity exprese vysoce aktivní alkalické fosfatázy a byl

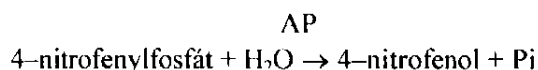
přidán 0,5% methanol (Mallinckrodit Baker B.V.) pro další indukci. Expresní experimenty byly prováděny po dobu 96 hodin.

5 Příklad 2

Test aktivity vysoce aktivní alkalické fosfatázy

Bylo odebráno 500 μ l expresní kultury z příkladu 1, byla zjištěna OD_{600} a buňky byly stočeny. Supernatant byl uskladněn a buněčný pelet byl resuspendován pro lýzi v množství Y-PERTM (50 až 300 μ l/Pierce) na odpovídající OD_{600} a třepán po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Lyzát pak byl stočen, aby se odstranila buněčná debris (15 000 x g/5 minut) a supernatant byl přenesen do čerstvých reakčních zkumavek. V testu aktivity pak bylo použito 5 μ l lyzátu.

15 Princip testu aktivity je tento.



20 Měří se zvýšení absorbance ve 405 nm.

50 μ l roztoku 4-nitrofenylfosfátu (0,67 mol/l 4-nitrofenylfosfátu, Na sůl (Roche Diagnostics GmbH)), bylo přidáno ke 3 ml diethanolaminového pufru (1 mol/l diethanolamin (Merck), pH 9,8, 0,5 mmol/l MgCl_2 (Riedel de Haenn)) a směs byla inkubována ve 37 °C. Pak byla započata reakce přidáním 5 μ l lyzátu a byla zjišťována změna absorbance ve 37 °C po dobu 3 minut a byla vypočtena $\Delta A/\text{min}$.

Aktivita pak byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$30 \quad \text{aktivita} = \frac{3,10}{\epsilon \times 0,005 \times l} \times \Delta A/\text{min} \times \frac{1}{\text{faktor} \times} \quad (\text{U/ml roztok vzorku})$$

$$\epsilon = 18,2 [l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

35 faktor x = faktor koncentrace po buněčné lýzi

Aktivita média supernatantu expresních kultur byla určována podobně. Reakce v tomto případě také začínala s 5 μ l supernatantu, ale navíc byl přidán 0,5mM ZnCl_2 . V tomto případě byl výpočet prováděn bez faktoru x.

Příklad 3

45 Klonování PCR fragmentu ze syntetického genu

PCR fragment byl znovu štěpen EcoRI a Asp718 (Roche Diagnostics GmbH), znovu izolován (QIAquick gel extraction kit/Qiagen), a pak ligován do vektorového fragmentu expresního vektoru pPICZ α A (Invitrogen), který byl linearizován s EcoRI a Asp718 (Roche Diagnostics GmbH) a izolován (QIAquick gel extraction kit/Qiagen). V tomto vektoru je syntetický gen pod kontrolou promotoru AOX 1 (promotor pro alkoholoxidázu 1 z *Picchia pastoris* a indukovatelný methanolem (Mallinckrodt Baker B.V.)) a je klonován do správného čtecího rámce za signální peptid α -faktoru z *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocí restriční analýzy a sekvencováním pak bylo vyšetřováno, zda takto vložený genový fragment byl bez chyb. Expresní vektor takto vytvořený, který

obsahuje syntetický gen, který kóduje eukaryotickou vysoce aktivní alkalickou fosfatázu, byl nazván pHAP10-3 (viz obr. 2).

Transformace pHAP10-3 v *Pichia pastoris*

5

Pro transformaci pHAP10-3 a *Pichia pastoris* X-33 a následnou integraci do genomu byl vektor nejdříve linearizován SacI (Roche Diagnostics GmbH). Transformace byla prováděna prostřednictvím elektroporace s použitím přístroje Gene Pulser II (Biorad).

10

Pro tento účel bylo 5 ml média YDP (Invitrogen) inokulováno kolonii *Pichia pastoris* a inkubováno přes noc za třepání ve 30 °C. 200 ml čerstvého média YPD (Invitrogen) pak bylo přenosem inokulováno v poměru 1:2000 kulturou pěstovanou přes noc a inkubováno přes noc za třepání ve 30 °C, dokud OD₆₀₀ nedosáhla hodnoty 1,3 až 1,5. Buňky byly stočeny (1500 x g/5 minut) a resuspendovány ve 100 ml ledově chladné sterilní vody (0 °C). Buňky byly opět stočeny a resuspendovány v 10 ml ledově chladného (0 °C) 1M sorbitolu (ICN). Buňky byly opět stočeny a resuspendovány v 0,5 ml ledově chladného (0 °C) 1M sorbitolu (ICN). Buňky takto získané byly drženy na ledu a okamžitě použity pro transformaci.

15

20

Přibližně 1 µg DNA linearizovaného vektoru pHAP10-3 bylo přidáno k 80 µl buněk a celá směs byla přenesena do ledově chladné (0 °C) elektroporační kyvety a inkubována dalších 5 minut na ledu. Pak byla kyveta přenesena do přístroje Gene Pulser II (Biorad) a byla prováděna transformace při 1 kV, 1 kΩ a 25 µF. Po elektroporaci byl ke směsi přidán 1 ml 1M sorbitolu (ICN) a následně bylo nanášeno 100 až 150 µl na YPDS misku s agarem (Invitrogen) obsahujícím 100 µg/ml Zeocinu^(R) (Invitrogen). Misky pak byly inkubovány při 30 °C po dobu 2 až 4 dnů.

25

Misky s médiem Raste MD (= minimální dextróza) byly naočkovány klony a byly dále analyzovány. Rostoucí klony byly vybrány, resuspendovány ve 20 µl sterilní vody, lyzovány 17,5 U lytiskázy (Roche Diagnostics GmbH) (1 hodina, 37 °C) a přímo vyšetřeny na správnou integraci syntetické AP expresní kazety pomocí PCR.

30

Klony, které integrovaly kompletní expresní kazetu během transformace do genomu, pak byly použity v expresních experimentech.

Expres vysoce aktivní alkalické fosfatázy

35

3 ml média BMGY (Invitrogen) bylo inokulováno pozitivními klony a inkubováno přes noc za třepání ve 30 °C. Pak byla určována OD v 600 nm a 10 ml média BMMY (Invitrogen) bylo inokulováno přenosem tak, aby byla získána OD₆₀₀ rovna 1. Médium BMMY (Invitrogen) obsahuje methanol (Mallinckrodt Baker B.V.), který indukuje expresi vysoce aktivní alkalické fosfatázy přes promotor AOX1.

40

45

Třepací láhve byly inkubovány za třepání při 30 °C, vzorky byly odebírány každých 24 hodin, byla zjišťována OD₆₀₀, byl prováděn test aktivity exprese vysoce aktivní alkalické fosfatázy a byl přidán 0,5% methanol (Mallinckrodt Baker B.V.) pro další indukci. Expresní experimenty byly prováděny po dobu 96 hodin.

Test aktivity vysoce aktivní alkalické fosfatázy

50

Bylo odebráno 500 µl expresní kultury, byla zjišťována OD₆₀₀ a buňky byly stočeny. Supernatant byl uskladněn a buněčný pelet byl resuspendován pro lyzi v množství Y-PERTM (50 až 300 µl/Pierce) na odpovídající OD₆₀₀ a třepán po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Lyzát byl pak stočen, aby se odstranila buněčná debris (15000 x g/5 minut) a supernatant byl přenesen do čerstvých reakčních zkumavek. V testu aktivity pak bylo použito 5 µl lyzátu.

55

Test aktivity byl prováděn tak, jak bylo popsáno výše.

Příklad 4

Zvýšení výtěžku exprese mnohonásobnou transformací

5 Nejlepší klony z expresních experimentů byly po řadě připraveny pro expprolaci, jak bylo popsáno výše, a opět transformovány 1 µg DNA linearizovaného vektoru pHAP10-3 a transformační směs byla nanášena na misky s agarem YPDS (Invitrogen) obsahujícím 1000 až 2000 µg/ml Zeocinu^(R) (Invitrogen). V důsledku toho byl selekční tlak zvýšen do takové míry, že mohly růst
 10 pouze klony, které integrovaly několik kopií expresního vektoru pHAP10-3, a tedy také několik kopií příslušného genu rezistence (v tomto případě na Zeocin^(R)) do genomu. Protein rezistence na Zeocin^(R) je produkt bleomycinového genu *Streptoalloteichus hindustanus* (Chalmers T. et al., Curr. Genet., 20, 309 až 314, 1991, Drocourt, D., et al., Nucleic Acid Research, 18, 4009, 1990), který váže Zeocin^(R) ve stechiometrickém poměru koncentrací, a tudíž činí buňky rezistentní na
 15 Zeocin^(R). Čím vyšší je koncentrace Zeocinu^(R) na miskách s agarem YPDS, tím více proteinu rezistence musí buňka vytvořit, aby kvantitativně vážala Zeocin^(R), a tak mohla růst. To je možné například tehdy, když byly do genomu integrovány mnohonásobné kopie genu rezistence. Jak je popsáno výše, klony byly transferem naočkovány na misky médiem Raste MD a analýzou PCR v nich byla opět kontrolována správná integrace haAP expresní kazety, jak je popsáno výše. Pak
 20 byly tyto klony po řadě testovány na aktivitu haAP, jak je popsáno výše.

Příklad 5

25 Zvýšení výtěžku exprese použitím druhého selekčního tlaku

Zvýšení koncentrace zeocinu^(R) nad 2000 µg/ml nevedlo ke zlepšení výtěžku exprese vysoce aktivní alkalické fosfatázy. Aby se dále zvýšil počet kopií genu v expresních klonech genu podle
 30 sekv. id. č. 5, který kóduje vysoce aktivní alkalickou fosfatázu a který má kodony optimalizované pro expresi ve kvasinkách, byla vybírána integrace dalších expresních vektorů do genomu expresního klonu pocházejícího z příkladů 3 a 4, který měl nejvyšší výtěžek exprese, pomocí druhého selekčního tlaku, výhodně G418 (Roche Diagnostics GmbH). Za tímto účelem byla celá expresní kazeta z pHAP10-3 obsahující promotor AOX1, signální peptid α-faktoru ze *Saccharomyces cerevisiae*, gen vysoce aktivní alkalické fosfatázy s optimalizovanými kodony podle sekv.
 35 id. č. 5 a úsek terminace transkripce AOX 1, izolovaná pomocí PCR s použitím náležitě vybraných primerů, jak jsou popsány níže, klonována do vektoru pIC9K, jehož integrace do genomu *Pichia pastoris* byla vybírána pomocí G418 (Roche Diagnostics GmbH). Primery jsou ukázány v sekv. id. č. 34 a 35.

40 PCR směs byla analyzována elektroforézou na agarózovém gelu, genový fragment mající očekávanou délku byl izolován QIAquick gel extraction kit/Qiagen), opět štěpen SacI a NotI (Roche Diagnostics GmbH), následně znovu izolován z agarózového gelu (QIAquick gel extraction kit/-Qiagen) a ligován do izolovaného vektorového fragmentu z pIC9K, který byl také linearizován SacI/NotI (Roche Diagnostics GmbH). To zajistilo, že celá expresní kazeta z pHAP10-3 se
 45 vyskytovala v identické formě v pPIC9K. Vložený fragment byl kontrolován pomocí restrikční analýzy sekvencováním s hraničními úseky. Expresní vektor takto vytvořený byl nazván pHAP10-3/9K (viz obr. 3).

Klony s nejvyšším výtěžkem exprese haAP z mnohonásobné transférmace s pHAP10-3
 50 (rezistence na zeocin) byly připraveny pro elektroporaci, jak je popsáno výše, a transformovány, jak je popsáno výše, 1 µg vektorového fragmentu z pHAP10-3/9K linearizovaného SacI (Roche Diagnostics GmbH). Transformační směs byla pak uskladněna po dobu 1 až 3 dnů ve 4 °C v 1M sorbitolu (ICN) (pro vytvoření rezistence na G418) a 100 až 200 µl bylo nanášeno na misky YPD (Invitrogen) obsahující 1, 2 a 4 mg/ml G418 (Roche Diagnostics GmbH) a misky byly inkubovány
 55 po dobu 3 až 5 dnů ve 30 °C. Výsledné klony byly opět vyšetřeny prostřednictvím testů

aktivity na zvýšenou expresi eukaryotické vysoce aktivní alkalické fosfatázy, jak je popsáno výše.

5 Seznam sekvencí

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.1

10

<210> 1

<211> 1476

<212> DNA

<213> Bovinní

15

<400> 1

```

gaattcctca tcccagctga ggaggaaaac cccgccttct ggaaccgcca ggcagcccag 60
gcccttgatg tagccaagaa gttgcagccg atccagacag ctgccaagaa tgtcatcctc 120
ttcttggggg atgggatggg ggtgcctacg gtgacagcca ctcggtatcct aaagggggcag 180
atgaatggca aactgggacc tgagacaccc ctggccatgg accagttccc atactgtggt 240
ctgtccaaga catacaacgt ggacagacag gtgccagaca ggcagggcac tgccactgcc 300
tacctgtgtg ggggtcaaggg caactacaga accatcggtg taagtgcagc cgcccgtac 360
aatcagtgc aacagacacg tgggaatgag gtcacgtctg tgatcaaccg ggccaagaaa 420
gcaggggaagg ccgtgggagt ggtgaccacc accaggggtg agcatgctc cccagccggg 480
gcctacggcg acacggtgaa ccgaaactgg tactcagacg ccgacctgcc tgctgatgca 540
cagaagaatg gctgccagga catcgccgca cagctggtct acaacatgga tattgacgtg 600
atcctgggtg gagggcgaat gtacatgttt cctgagggga cccagacccc tgaataccca 660
gatgatgcca gtgtgaatgg agtccggaag gacaagcaga acctggtgca ggaatggcag 720
gccaaagcacc agggagccca gtatgtgtgg aaccgcactg cgtccttcca ggcgccgat 780
gactccagtg taacacacct catgggcctc tttgagccgg cagacatgaa gtataatgtt 840
cagcaagacc acaccaagga cccgacctg gcggagatga cggaggcggc cctgcaagtg 900
ctgagcagga accccgggg cttctacctc ttcgtggagg gaggcgcgat tgaccacggt 960
caccatgacg gcaaagctta tatggcactg actgaggcga tcatgtttga caatgccatc 1020
gccaaaggcta acgagctcac tagcgaactg gacacgctga tccttgtcac tgcagaccac 1080
tcccattgtc tctcttttgg tggctacaca ctgcgtggga cctccatttt cgggtctggcc 1140
ccgggcaagg ccttagacag caagtccctc acctccatcc tctatggcaa tggcccaggc 1200
tatgcgcttg gcgggggctc gagggccgat gttaatggca gcacaagcga ggaacctca 1260
taccggcagc agggcgccgt gcccttggt agcgagaccc acgggggcca agacgtggcg 1320
gtgttcgcgc gagggccgca ggcgcacctg gtgcacggcg tgcaggagga gaccttcgtg 1380
gcgcacatca tggcctttgc gggctgcgtg gagccctaca ccgactgcaa tctgccagcc 1440
cccgccaccg ccaccagcat ccccgactag ggtacc 1476

```

<210> 2

<211> 40

20

<212> DNA

<213> Syntetické sekvence

<220>

<223> Popis syntetické sekvence: syntetická 1

25

<400> 2

gcgcgaattc ctcatcccag ctgaggagga aaacccccgc

40

<210> 3

<211> 36

30

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223> Popis syntetické sekvence: syntetická

5

<400> 3

cgcgggtacc ctagtcgggg atgctggtgg cgggtgg

36

<210>4

10

<211> 487

<212> PRT

<213> Bovinni

<400> 4

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala
1 5 10 15

Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala
20 25 30

Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr
35 40 45

Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly
50 55 60

Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser
65 70 75 80

Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Arg Thr Ile Gly Val
100 105 110

Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu
115 120 125

Val Thr Ser Val Ile Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala Val Gly
130 135 140

Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr
145 150 155 160

Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala
165 170 175

Asp Ala Gln Lys Asn Gly Cys Gln Asp Ile Ala Ala Gln Leu Val Tyr
180 185 190

Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Met Tyr Met Phe
195 200 205

Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Ala Ser Val Asn
210 215 220

Gly Val Arg Lys Asp Lys Gln Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys
225 230 235 240

15

His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala
 245 250 255
 Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala
 260 265 270
 Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu
 275 280 285
 Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg
 290 295 300
 Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His
 305 310 315 320
 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn
 325 330 335
 Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile
 340 345 350
 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380
 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400
 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415
 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430
 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445
 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460
 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
 465 470 475 480
 Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
 485

<210>5

<211> 1476

<212> DNA

5 <213> Syntetická sekvence

<220>

<223> Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 5

```

gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagcttttt ggaatagaca agctgetcaa 60
gcttttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaaactg ctgctaagaa tgttattttg 120
tttttgggtg atggtatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaaggggtcaa 180
atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaatttcc atacgttgct 240
ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatt ctgctgggtac tgctactgct 300
tacttgtgtg gtgttaaggg taattacaga actattgggtg tttctgctgc tgctagatac 360
aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttactaatag agctaagaag 420
gctggtaagg ctgttgggtg tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggg 480
gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatget 540
caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatgtt 600
attttgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagacc agaatacca 660
gatgatgctt ctgttaatgg tgtagaaag gataagcaaa atttgggttca agaattggca 720
gctaagcatc aagggtgctc atatgtttgg aatagaactg ctttggttgca agctgctgat 780
gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatgtt 840
caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt 900
ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggt 960
catcatgatg gtaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt 1020
gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttggttac tgctgatcat 1080
agtcattgtt tttcttttgg tggttacact ttgagaggta cttctatttt tggtttggct 1140
ccaggtaagg ctttggatag taagtcttac acttctattt tgtatggtaa tgggtccagg 1200
tatgcttttg gtgggtggtc tagaccagat gttaatggta gtactagtga agaaccatct 1260
tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atgggtgggtga agatgttgct 1320
gtttttgcta gaggtccaca agctcatttg gttcatgggt ttcaagaaga aacttttgtt 1380
gctcatatta tggcttttgc tggttgtgtt gaaccataca ctgattgtaa tttgccagct 1440
ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc 1476

```

<210>6

<211> 78

5 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223> Popis syntetické sekvence: syntetická

10

<400> 6

```

gcgcgaattc ttgattccag ctgaagaaga aaatccagct ttttgggaata gacaagctgc 60
tcaagctttg gatgttgc 78

```

<210>7

<211> 70

15 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223> Popis syntetické sekvence: syntetická

20

<400> 7

```

ccaaaaacaa aataacatto ttagcagcag tttgaattgg ttgcaacttc ttagcaacat 60
ccaaagcttg 70

```

<210>8

<211> 69

25 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 8

5 gaatggttatt ttgttttttg gtgatgggtat ggggtgttoca actgtttactg ctactagaat 60
 tttgaaggg 69

<210>9

<211> 70

<212> DNA

10 <213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

15 <400> 9

 ggaaattgat ccatagccaa tggagtttct ggacccaact taccattcat ttgacccttc 60
 aaaattctag 70

<210> 10

<211> 71

<212> DNA

20 <213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

25 <400> 10

 gctatggatc aatttccata cgttgctttg tctaagactt acaatgttga tagacaagtt 60
 ccagattctg c 71

<210>11

<211> 71

<212> DNA

30 <213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

35 <400> 11

 ccaatagttc tgtaattacc cttaacacca cacaagtaag cagtagcagt accagcagaa 60
 tctggaactt g 71

<210>12

<211> 72

<212> DNA

40 <213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

45 <400> 12

 gtaattacag aactattggg gtttctgctg ctgctagata caatcaatgt aatactacta 60
 gaggtaatga ag 72

<210>13
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 5
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 13
 agtaacaaca ccaacagcct taccagcctt cttagctcta ttaataacag aagtaacttc 60
 attacctcta gtag 74
 10
 <210>14
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 15
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 14
 gctggttggtg ttgttactac tactagagtt caacatgctt ctccagctgg tgcttacgct 60
 catactgtta atag 74
 20
 <210>15
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 25
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 15
 caaccattct tttgagcctc agctggcaaa tcagcatcag agtaccaatt tctattaaca 60
 gtatgagc 68
 30
 <210>16
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 35
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 16
 gatgctcaaa agaatgggtg tcaagatatt gctgctcaat tggtttataa tatgg 55
 40
 <210>17
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 45
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 17

ccttctggaa acatgtacat tctaccacca cccaaaataa catcaatatc catattgtaa 60
accaattgag ca 72

<210>18

5 <211> 71

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

10 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 18

gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca gatgatgctt ctgttaatgg 60
tgtagaaag g 71

<210>19

15 <211> 73

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

20 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 19

catattgagc accttgatgc ttagcttgcc attcttgaac caaattttgc ttatcctttc 60
taacaccatt aac 73

<210>20

25 <211> 71

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

30 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 20

gcatcaaggt gctcaatatg tttggaatag aactgctttg ttgcaagctg ctgatgattc 60
tagtgttact c 71

<210>21

35 <211> 54

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

40 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 21

cttcatatca gctggttcaa acaaaccat caaatgagta acactagaat catc 54

<210>22
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 5
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 22
 gaaccagctg atatgaagta taatgttcaa caagatcata ctaaggatcc aactttggc 59
 <210>23
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 15
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 23
 cctcttggat ttctagacaa aacttgcaaa gcagcttcag tcattttcagc caaagttgga 60
 tccttag 67
 <210> 24
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 25
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 24
 gtctagaaat ccaagaggtt tttacttggt tgttgaaggt ggtagaattg atcatgggtca 60
 tcatgatgg 69
 <210> 25
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 35
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická
 <400> 25
 ccttagcaat agcattatca aacataatag cttcagtcaa agccatataa gccttaccat 60
 catgatgacc atg 73
 <210> 26
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Syntetická sekvence
 45
 <220>
 <223>Popis syntetické sekvence: syntetická

<400> 26

gataatgcta ttgctaaggc taatgaattg acttctgaat tggatacttt gattttgggtt 60
actgctgac atag 74

<210> 27

<211> 73

5 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

10

<400> 27

ccaaacaaaa aatagaagta cctctcaaag tgtaaccacc aaaagaaaaa acatgactat 60
gatcagcagt aac 73

<210> 28

<211> 73

15 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

20

<400> 28

cttctatttt ttggtttggct ccaggtaagg ctttggatag taagtcttac acttctattt 60
tgtatggtaa tgg 73

<210> 29

<211> 76

25 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

30

<400> 29

ctagtactac cattaacatc tgggtctagaa ccaccaccca aagcataacc tggaccatta 60
ccatacaaaa tagaag 76

<210> 30

<211> 77

35 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

40

<400> 30

gatgttaatg gtagtactag tgaagaacca tcttacagac aacaagctgc tgttccattg 60
gctagtgaaa ctcatgg 77

<210> 31

<211> 73

45 <212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

5

<400> 31

caccatgaac caaatgagct tgtggacctc tagcaaaaac agcaacatct tcaccaccat 60
gagtttcact agc 73

<210> 32

<211> 74

10

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

15

<400> 32

gctcatttgg ttcatggtgt tcaagaagaa acttttgttg ctcatattat ggcttttgc 60
ggttgtgttg aacc 74

<210> 33

<211> 82

20

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

25

<400> 33

gcgcggtacc ttaatctgga atactagtag cagtagctgg agctggcaaa ttacaatcag 60
tgtatggttc aacacaacca gc 82

<210> 34

<211> 31

30

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

35

<400> 34

gcgcgcctag gagatctaac atccaaagac g 31

<210> 35

<211> 29

40

<212> DNA

<213> Syntetická sekvence

<220>

<223>Popis syntetické sekvence: syntetická

45

<400> 35

cgcgcgctag cggatccgca caaacgaag

29

<210> 36

<211> 10

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 36

Glu Ala Glu Ala Glu Phe Leu Ile Pro Ala

1

5

10

10 <210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

15 <400> 37

Leu Ile Pro Ala

1

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

20 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 38

Glu Ala Glu Ala Glu Phe

1

5

25

PATENTOVÉ NÁROKY

30

1. Způsob produkce eukaryotické alkalické fosfatázy v kvasinkových buňkách, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že se

35

I) a₁) genová sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy klonuje do prvního vektoru majícího gen rezistence pro první selekční marker;

a₂) genová sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy se klonuje do druhého vektoru majícího gen rezistence pro druhý selekční marker;

přičemž první selekční marker se liší od druhého selekčního markeru;

40

b) kvasinkové buňky se transformují prvním vektorem z kroku a₁) a transformanty, které integrovaly gen rezistence pro první selekční marker a genovou sekvenci eukaryotické alkalické fosfatázy do genomu se vybírají růstem na živném médiu obsahujícím nízkou koncentraci prvního selekčního markeru,

45

c) počet kopií genu v buňkách získaných v kroku b) se zvýší několikanásobnou transformací prvním vektorem, přičemž několikanásobné transformanty se vybírají růstem na živném médiu při zvýšeném selekčním tlaku,

d) několikanásobné transformanty z kroku c) se transformují druhým vektorem z kroku a₂, a transformanty, které integrovaly gen rezistence pro druhý selekční marker a genovou sekvenci eukaryotické alkalické fosfatázy do genomu se vybírají růstem na živném médiu obsahujícím nízkou koncentraci druhého selekčního markeru.

5 e) počet kopií genu v buňkách získaných v kroku d) se zvýší několikanásobnou transformací druhým vektorem, přičemž několikanásobné transformanty se vybírají růstem na živném médiu při zvýšeném selekčním tlaku.

f) vyberou se ty klony, které do genomu stabilně integrovaly několik kopií genové sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy a geny rezistence pro selekční markery;

10

II) v klonech z kroku I) f) se exprimuje genová sekvence eukaryotické alkalické fosfatázy; a

III) alkalická fosfatáza získaná z kroku II) se purifikuje.

15

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že genová sekvence odpovídá sekv. id. č. 1.

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že genová sekvence odpovídá sekv. id. č. 5.

20

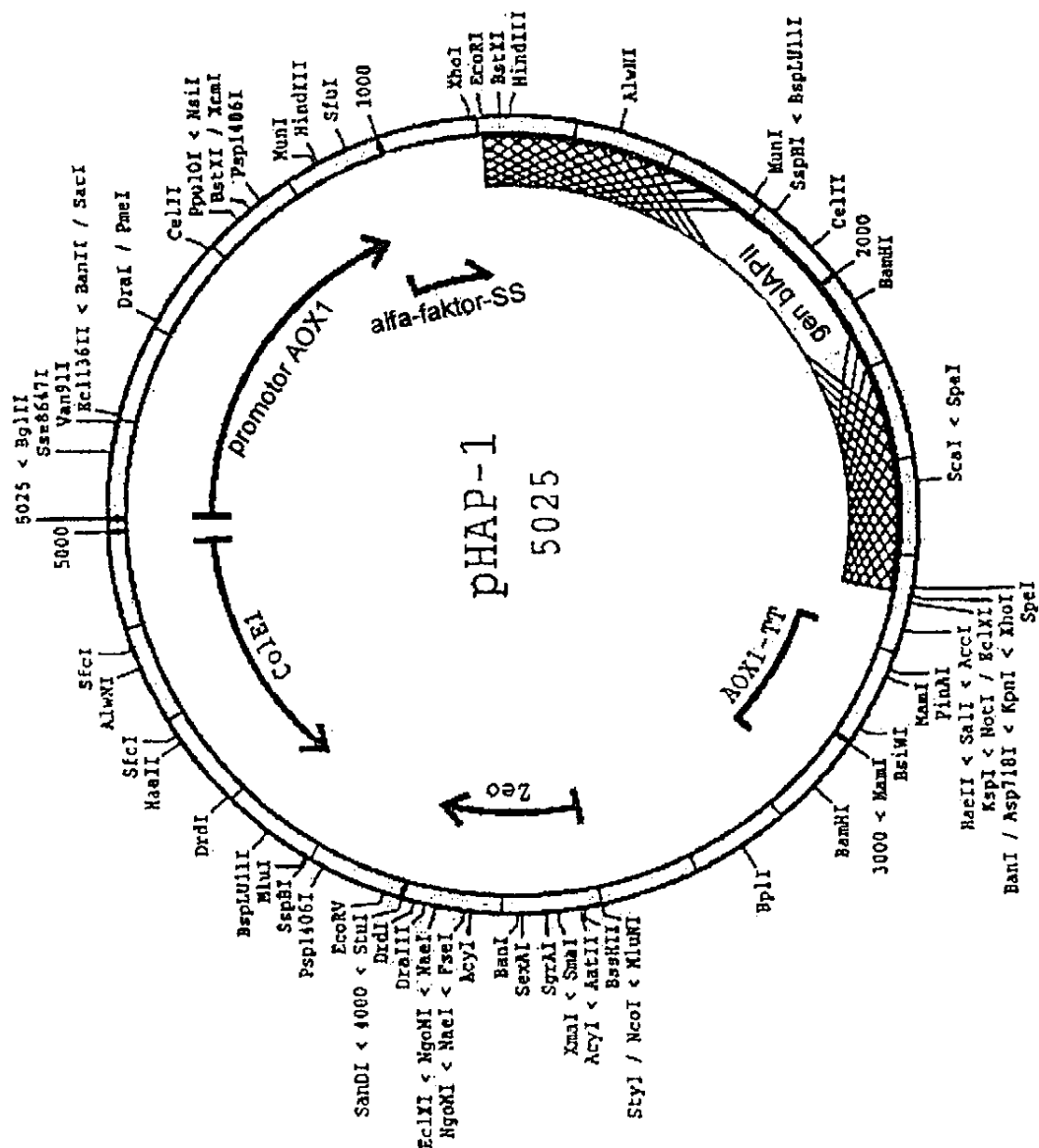
4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se používá methylotrófních kvasinek.

25

5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že se jako kvasinkového kmene používá kmeny *Pichia pastoris* nebo *Hansenula polymorpha*.

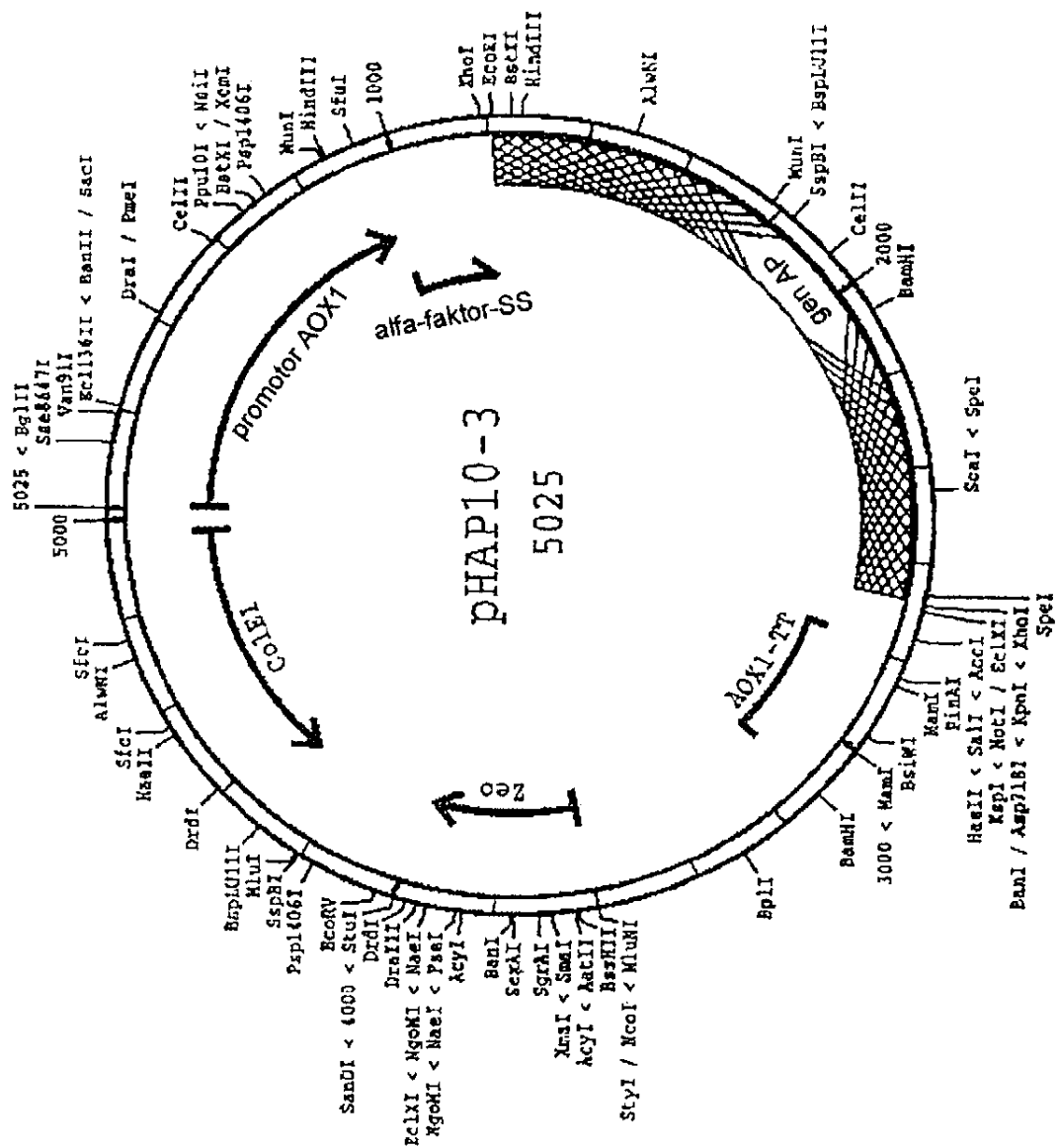
30

3 výkresy



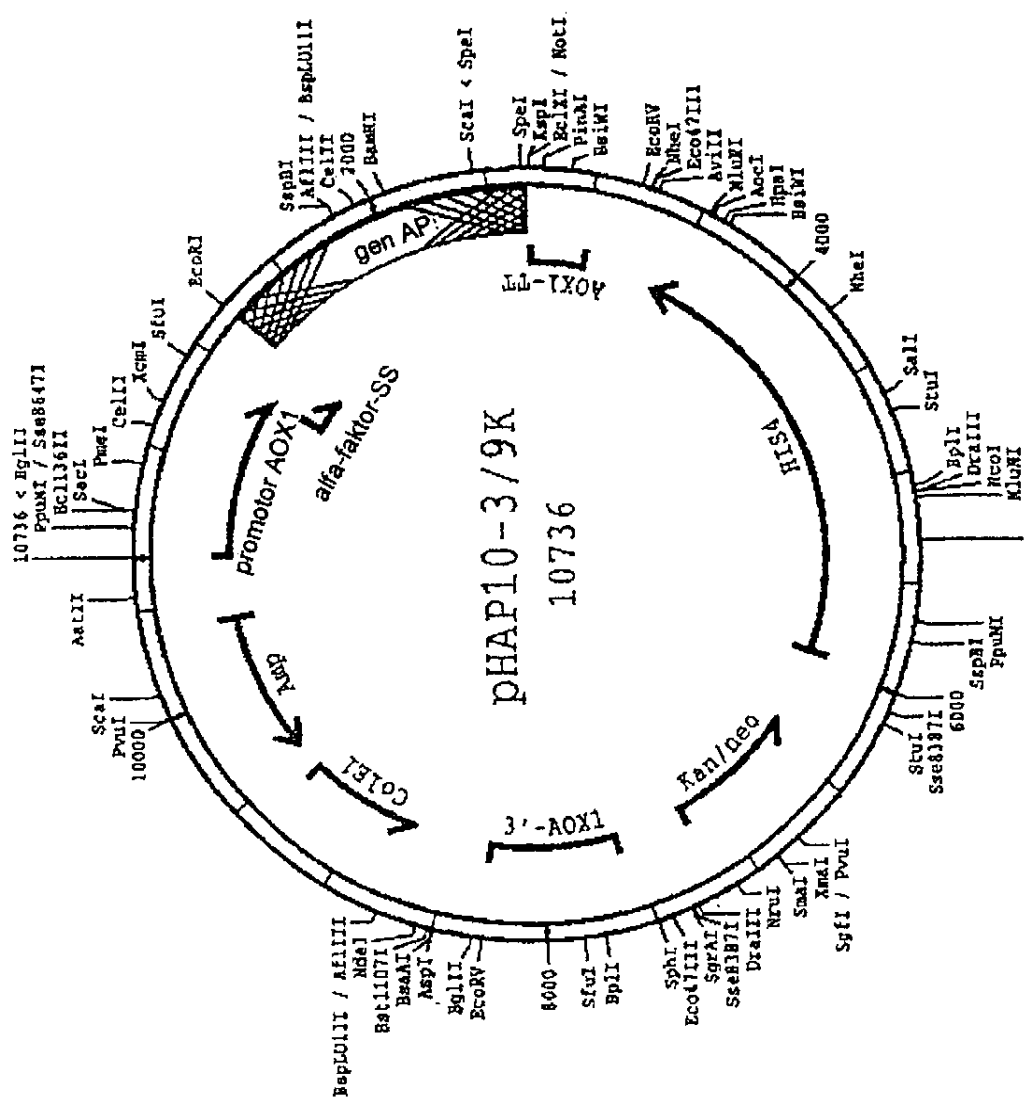
Gen bAPII pro vysoce aktivní AP vložený pomocí EcoRI/Asp718 do pICZalfa

Obr. 1



Syntetický gen pro vysoce aktivní AP vložený pomocí EcoRI/Asp718 do pCZalfa

Obr. 2



PCB produkt bAP10-3 (JM105)/PIC5a3a vložení pomocí SacI/NotI do pPIC9K

Mismatch: 0 MinCuts = 1 MaxCuts: 2

Se 198 enzymy: *

Obr. 3

Konec dokumentu