

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-2337

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/76

C 12 N 15/57

C 12 N 1/19

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.02.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.02.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/01102342**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:

(Věstník č. 4/2004)

(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/001072**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/061064**

(71) Přihlašovatel:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH

(72) Původce:

Müller Rainer, Penzberg, DE

Glaser Stephan, Seeshaupt, DE

Geipel Frank, Penzberg, DE

Thalhofer Johann-Peter, Weilheim, DE

Rexer Bernhard, Weilheim, DE

Schneider Claus, Eppelheim, DE

Ratka Michael, Mannheim, DE

Ronning Stephanie, Penzberg, DE

Eckstein Hellmut, Weilheim, DE

Giessel Claudia, Greiling, DE

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob produkce rekombinantního trypsinu

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu produkce rekombinantního trypsinu z prasečího pankreatu v *Pichia* pastorie, který je rozpustný a je sekretován do kultivačního média, jehož exprese při pH 3,0 - 4,0, do značné míry zabraňuje aktivaci trypsinogenu na β -trypsin a autolyzi β -trypsinu α -trypsinem na ϵ -trypsin z něj na neaktivní peptidy.

CZ 2003 - 2337 A3

Způsob produkce rekombinantního trypsinu

Popis

Vynález se týká způsobu rekombinantní produkce trypsinu. Za tímto účelem je výhodně exprimován trypsinogen se zkrácenou propeptidovou sekvencí v rekombinantní hostitelské buňce a sekretován do kultivačního média v neštěpené formě. Následně je propeptidová sekvence kontrolovaným způsobem štěpena, za vytvoření aktivního trypsinu.

Trypsin je serinová proteasa, která katalyzuje hydrolytické štěpení peptidů v karboxylové skupině bazických aminokyselin argininu a lysinu (Keil B., 1971). Trypsin z hovězího pankreatu byl jedním z prvních proteolytických enzymů, které mohly být použity v čisté formě a v adekvátních množstvích pro přesné chemické a enzymové studie (Northrop et al., 1948). Následně bylo také možné, izolovat proteasy, které mohou být zařazeny do trypsinové rodiny, z jiných vyšších obratlovců (prase - Charles et al. 1963 / ovce - Bricteux-Gregoire et al. (1966); Travis (1968) / krocan - Ryan (1965) / lidé - Travis et al. (1969) a další). V této době byly také izolovány první enzymy, náležící do trypsinové rodiny, ze dvou druhů streptomycet (Moriyama a Tsuzuki (1968); Trop a Birk (1968); Wählby a Engström (1968); Wählby (1968; Jurasek et al. (1969)).

Enzym je syntetizován v pankreatických buňkách obratlovců, jako inaktivní prekursor, trypsinogen, a následně je přeměněn na aktivní formu štěpením propeptidu (Northrop et al. (1948), Desnuelle (1959)). První molekuly trypsinogenu byly aktivovány přirozeně enteropeptidasou enterokinasou, která hydrolyzuje peptidovou vazbu mezi (Asp₄)-Lys-Ile, což odštěpuje propeptid (Keil (1971)). Rozpoznávací sekvence enterokinasy (Asp₄)-Lys je umístěna přímo na C-konci propeptidu, téměř u všech, dříve známých, molekul trypsinogenu (Light et al. (1980)). Proces

aktivace může být také proveden autokatalyticky při fyziologických hodnotách pH, protože lysin je umístěn na C-terminální straně rozpoznávací sekvence enterokinasy a tak může být peptidová vazba Lys-Ile také hydrolyzována trypsinem (Light et al. (1980)).

Trypsin byl vždycky zajímavou proteasou pro biotechnologické aplikace, díky jeho snadné dostupnosti z různých savců, vysoké specifitě (štěpí pouze na C-terminální straně lysinu nebo argininu) spolu s vysokou specifickou aktivitou (~ 150 U/mg) a jeho dobré stabilitě během skladování. Trypsin je zejména používán pro tryptické štěpení peptidů na malé části pro sekvenování, pro uvolnění adherentních buněk z potažených misek pro buněčné kultury a pro štěpení fúzních proteinů na cílový peptid a fúzní složku, pro aktivaci propeptidů (např. trypsinogenu na trypsin) a pro rekombinantní produkci peptidových hormonů (např. proinsulinu na insulin, viz také WO 99/10503). Trypsin je také součástí některých farmaceutických přípravků (mastí, dražé a aerosolů pro inhalaci ("Rote Liste", 1997; The United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP23-NF18, 1995)). Jelikož použití enzymů ze zvířecích zdrojů není již v mnoha případech povoleno (možná kontaminace infekčními činidly), musí být pro žádané biotechnologické aplikace poskytnuty molekuly rekombinantního trypsinu z mikrobiálních hostitelů.

Existuje několik způsobů pro produkci rekombinantního trypsinu z různých organismů.

Graf, L. et al (1987 a 1988) popisuje expresi a sekreci krysích trypsinových a trypsinogenových mutantů v *E. coli*. Za účelem sekrece molekul trypsinogenu do periplasmy *E. coli*, je přirozená signální sekvence trypsinogenu nahrazena signální sekvencí bakteriální alkalické fosfatasy (*phoA*). Sekretované inaktivní molekuly trypsinogenu jsou izolovány z periplasmy a jsou aktivovány enzymovým štěpením, použitím purifikované enterokinasy.

Vasquez, J.R. et al. (1989) popisuje expresi a sekreci anionického kryšního trypsinu a trypsinových mutantů v *E. coli*. Za účelem exprimovat a sekretovat molekuly aktivního trypsinu do periplasmy *E. coli*, je přirozený prepro segment trypsinogenu (signální sekvence a aktivační peptid) nahrazen signální sekvencí bakteriální alkalické fosfatasy (*phoA*) a je použit *phoA* promotor, který může být regulován fosfátem. Aktivní trypsin je izolován z periplasmy. Výtěžek je však velmi nízký (cca. 1 mg/l).

Higaki, J.N. et al. (1989) popisuje expresi a sekreci trypsinu a trypsinových mutantů do periplasmy *E. coli*, použitím *tac* promotoru a signální sekvence *hisJ* *S.typhimurium*. Výtěžek aktivního trypsinu je cca. 0,3 mg/l. Objemový výtěžek aktivního anionického kryšního trypsinu může být zvýšen na přibližně 50 mg/l, pomocí fermentace s vysokou hustotou buněk (Yee, L. a Blanch, H.W., (1993)). Autoři však poukazují na problémy v expresi a sekreci aktivního trypsinu v *E. coli*. Enzymaticky aktivní trypsin je vytvořen v periplasmě *E. coli* po štěpení signální sekvence a proteinovým sbalením nativního trypsinu se vytváří 6 disulfidových můstků. Tvorba aktivního trypsinu je pro buňku toxická, protože aktivní trypsin hydrolyzuje periplasmatické proteiny *E. coli*, které lyzují buňky. Kromě toho, je v periplasmě *E.coli* zabráněno proteinovému sbalení trypsinu a zejména správné nativní tvorbě 6 disulfidových můstků. Tento systém není vhodný pro izolaci relativně velkých množství trypsinu (> 10 mg; Willett, W.S. et al., (1995)).

Za účelem produkovat větší množství trypsinu (50-100 mg) pro rentgenové krystalografické studie, je v kvasinkách produkován inaktivní trypsinogenný prekursor, pod kontrolou regulovatelného *ADH/GAPDH* promotoru a je sekretován pomocí fúze s vedoucí sekvencí kvasinkového α faktoru. Expresní produkt, sekretovaný do média, je kvantitativně přeměněn *in vitro* na trypsin, pomocí enterokinasy. Výtěžek je 10-15 mg/l (Hedstrom, L. et al. (1992)).

DNA sekvence jsou popsány v EP 0 597 681, které kódují maturní hovězí trypsin a hovězí trypsinogen, s reziduem iniciačního methioninu. Navíc, je popsána exprese v *E. coli*, ale není vysvětlena strategie, jak je v *E. coli* vytvořen aktivní trypsin.

Způsob produkce trypsinu z prasečího pankreatu nebo jeho derivátu v *Aspergillus* rekombinantním způsobem, je popsán v WO 97/00316. Pro transformaci je použit vektor, který kóduje trypsinogen nebo jeho derivát, který je N-koncově fúzován k funkčnímu signálnímu peptidu. Avšak, kvasinkové kultury dosahují vyšších koncentrací biomasy, ve srovnání s kulturami *Aspergillus* a rostou podstatně rychleji a proto může být výtěžek specifické exprese u kvasinkové buňky nižší než pro buňky *Aspergillus*, za účelem dosažení výtěžků, které jsou potřebné pro ekonomický způsob exprese.

Způsob rekombinantní produkce prekursorů zymogenů proteás, které obsahují autokatalytické štěpící místo, které se přirozeně nevyskytuje, je popsáno v WO 99/10503. Tento způsob zahrnuje expresi prekursoru zymogenu v *E. coli*, ve formě inkluzních tělísek, s následnou purifikací a renaturací za podmínek, při kterých je vytvořena proteásová část prekursoru zymogenu, ve své přirozené konformaci a ke štěpení renaturovaného prekursoru zymogenu poté dochází autokatalyticky. Nevýhodou tohoto způsobu jsou velké ztráty, které se často vyskytují během renaturace a velké objemy, které jsou vyžadovány pro průmyslovou výrobu.

Rekombinantní produkce trypsinových analog v *Pichia pastoris* je popsána v WO 00/17332. Pro transformaci je použit vektor, který kóduje analog trypsinogenu (derivát hovězího trypsinogenu), ve kterém byla C-koncová aminokyselina lysin mutací změněna za jinou aminokyselinu (kromě argininu nebo lysinu) a který je N terminálně fúzován k funkčnímu signálnímu peptidu. V tomto způsobu jsou analoga trypsinu sekretována do média v rozpustné formě a díky vložené mutaci nejsou také aktivována a dále

degradována nežádoucí autokatalýzou, dokonce při relativně vysokých hodnotách pH fermentačního procesu. Pro aktivaci je poté použita aminopeptidasa. Nevýhodou tohoto způsobu je však potřeba odstranit další aminopeptidasy, které mohou mít nevýhodné vedlejší aktivity pro následné použití trypsinu ve finálním procesu.

Expresí genů trypsinogenu, vyskytujících se přirozeně v přírodě, v *Pichia pastoris* je popsána v WO 01/55429. Za účelem vyhnout se autokatalytické aktivaci je fermentace v příkladu prováděna v méně kyselé oblasti pH při cca. 6. To je tedy mimo optimální pH oblast, která zabraňuje autokatalytické aktivaci během dlouhých časů v expresní fázi. Dalšími nevýhodami tohoto způsobu jsou geny pro trypsinogen, které nejsou kodónově optimalizovány pro expresi v *Pichia pastoris* a přispívají k nízkým výtěžkům exprese.

Předmětem vynálezu je poskytnout způsob produkce rekombinantního trypsinu, ve kterém jsou nevýhody přednostního oboru alespoň částečně eliminovány a který dovoluje, aby byl získán aktivní trypsin jednoduchým způsobem s vysokým výtěžkem a aktivitou. Zejména by mělo být možné izolovat trypsinogen, jako meziprodukt, v rozpustné formě z kultivačního média exprese hostitele, který by neměl být podroben žádnému významnému stupni autokatalytické aktivace během fermentace a purifikace. Dále by mělo být možné následně aktivovat trypsinogen autokatalyticky anebo přidavkem rekombinantního trypsinu.

Předmětu podle vynálezu je dosaženo pomocí způsobu rekombinantní produkce trypsinu, zahrnující tyto kroky:

- a) transformace hostitelských buněk rekombinantní nukleovou kyselinou, která kóduje trypsinogen s místem, rozpoznávaným enterokinasou, v sekvenci propeptidu v sekretovatelné formě, výhodně fúzovaného k signálnímu peptidu, který zprostředkovává sekreci,
- b) kultivace hostitelských buněk za podmínek, které umožňují expresi rekombinantní nukleové kyseliny a sekreci

expresního produktu do kultivačního média, tyto podmínky jsou vybrány tak, že autokatalytickému štěpení propeptidové sekvence je alespoň podstatně zabráněno,

- c) izolace expresního produktu z kultivačního média,
- d) štěpení propeptidové sekvence, za vytvoření aktivního trypsinu a
- e) dle volby oddělení neštěpených molekul trypsinogenu od aktivního trypsinu.

Hostitelské buňky použité ve způsobu podle vynálezu mohou být eukaryotické nebo prokaryotické hostitelské buňky, jako ty, které jsou známy v přednostním oboru. Hostitelské buňky jsou výhodně eukaryotické buňky, zejména výhodně buňky plísni a nejvýhodněji kvasinkové buňky. Vhodné příklady kvasinkových buněk jsou *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, kde methylotrófní kvasinky, takové, jako *Pichia pastoris* nebo *Hansenula polymorpha* a zejména *Pichia pastoris* jsou použity přednostně.

Je vhodné použít hostitelské buňky, které jsou schopné exprimovat rekombinantní nukleovou kyselinu a sekretovat expresní produkt do kultivačního média za podmínek, za kterých je autokatalytickému štěpení propeptidové sekvence alespoň podstatně, a výhodně v podstatě kvantitativně, zabráněno. Takové podmínky výhodně zahrnují kyselou hodnotu pH kultivačního média, zejména výhodně hodnotu pH v rozmezí mezi 3 a 4. Trypsinogen je stabilní při kyselějších hodnotách pH a zejména při hodnotách pH do 4, zatímco trypsin je autokatalyticky aktivován v neutrálním nebo alkalickém médium (Keil, B. (1971)).

Kultivace za vhodných podmínek, taková, jaká je ve způsobu podle vynálezu, zabraňuje předčasné aktivaci rekombinantního trypsinogenu, sekretovaného hostitelskými buňkami, která může také podstatně zabránit další degradaci výsledného trypsinu až na inaktivní peptidy. Stabilita rekombinantního trypsinogenu za kultivačních podmínek je důležitá, protože exprese by mělo být

doprovázena sekrecí. Má se za to, že v tomto spojení je sekrece z hostitelské buňky přemístěním trypsinogenu z cytoplasmy přes buněčnou membránu do kultivačního média. Toto je většinou uskutečněno pomocí N-terminální fúze trypsinogenu s funkčním signálním peptidem. Příklady vhodných signálních peptidů jsou známé signální peptidy z kvasinek a zejména výhodný je signální peptid α faktoru ze *Saccharomyces cerevisiae*. Je však samozřejmě možné, použít jiné signální peptidy např. signální peptid, který přirozeně kontroluje sekreci trypsinogenu.

Za účelem vylepšit výtěžek exprese rekombinantního trypsinu je výhodné použít rekombinantní nukleovou kyselinu s optimalizovaným využitím kodonů pro příslušné hostitelské buňky. Podle toho je výhodné použít nukleovou kyselinu pro kvasinkové buňky, která má optimalizované využití kodonů pro kvasinky. Takové nukleové kyseliny, které mají optimalizované využití kodonů, mohou být například vytvořeny syntetizováním jednotlivých oligonukleotidů paralelně a jejich následným spojením.

Způsob podle Vynálezu je v podstatě vhodný pro produkci jakýchkoliv typů rekombinantního trypsinu za předpokladu, že příslušný trypsinogen, který je sekretován jako expresní produkt hostitelskými buňkami, je za kultivačních podmínek v podstatě stabilní. Způsob je vhodně použit pro produkci trypsinu z obratlovců, zejména ze savců, takových, jako prasata, ovce nebo lidé. Zejména výhodně je produkován prasečí trypsin.

Navíc je přednostní, že je použita taková rekombinantní nukleová kyselina, která kóduje trypsinogen se zkrácenou propeptidovou sekvencí. Trypsinogenem je rozuměn protein, který, ačkoliv vytváří v podstatě správnou proteinovou strukturu, nemá žádnou nebo má velmi malou proteolytickou aktivitu, v porovnání s aktivním trypsinem, která je výhodně alespoň 5-krát a zejména výhodně alespoň 10-krát nižší, než proteolytická aktivita aktivní formy. Přirozená délka propeptidové části, např. v případě prasečího trypsinogenu 25 aminokyselin, je výhodně zkrácena na

propeptidovou sekvenci, která sestává pouze z rozpoznávací sekvence pro enteropeptidasu např. enterokinasu např. aminokyselinová sekvence Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Dle volby, může být k N-konci rozpoznávací sekvence enterokinasy připojeno několik dalších aminokyselin, nutných pro klonování, např. do 5 aminokyselin.

Bylo zjištěno, že exprese zkráceného rekombinantního trypsinogenu podle vynálezu, obsahujícího aminokyseliny Glu-Phe, připojené z důvodu klonování k N-konci rozpoznávacího místa enterokinasy, vede k značně vyšším výtěžkům, než je tomu v případě exprese přirozeného trypsinogenu, ve způsobu podle vynálezu. Z tohoto důvodu je v konkrétní přednostní formě způsobu podle vynálezu použita rekombinantní nukleová kyselina, jejíž nukleotidová sekvence je ukázaná v SEQ ID NO.22, která kóduje prasečí trypsinogen se zkrácenou propeptidovou sekvencí.

Ve způsobu podle vynálezu je exprese rekombinantního trypsinogenu výhodně kontrolována indukovatelnou, expresi kontrolující sekvencí. Z tohoto důvodu může být nárůst hostitelských buněk proveden před indukcí exprese, za podmínek, které jsou výhodné nebo optimální pro růst hostitelských buněk. Proto například může růst probíhat při pH 5-7, zejména při pH 5-6 až do předem stanovené optické hustoty, během níž je sekvence regulovatelná kontroly exprese potlačena. Exprese může být poté indukována změnou teploty anebo přidavkem induktoru. Příkladem přednostní sekvence kontrolované exprese je AOX 1 - promotor z *Pichia pastoris*, který může být indukován methanolem, který je zejména vhodný pro indukovatelnou expresi v methylotrófních kvasinkách. Kultivační podmínky jsou výhodně změněny před indukcí sekvence kontrolované exprese takovým způsobem, který například změni pH na oblast 3-4, kde se trypsinogen vytvořený expresí rekombinantní nukleové kyseliny akumuluje v intaktní formě v kultivačním médiu.

Kultivační podmínky ve způsobu podle vynálezu jsou vybrány tak,

že je do značné míry zabráněno autokatalytickému štěpení propeptidové sekvence. Po izolaci produktu exprese z kultivačního média může být propeptidová sekvence odštěpena za kontrolovaných podmínek. Toto štěpení může být například provedeno přidavkem rekombinantního trypsinu anebo autokatalytickým štěpením. V tomto spojení je autokatalytickým štěpením rozuměna aktivace rekombinantního trypsinogenu sebou samým, která může být dle volby urychlena přidavkem malých množství rekombinantního trypsinu ale bez přidavku cizího proteinu. V tomto způsobu není nutné použít další cizí protein, který je obvykle odvozen ze surového materiálu z živočišných zdrojů a musí být následně znovu odstraněn, což může způsobit nežádoucí štěpení v následné aplikaci. K autokatalytické aktivaci výhodně dochází při pH v rozmezí 7-8. Toto zajišťuje, že trypsinogen, vytvořený během exprese, může být prvně vysoce purifikován v silně kyselé oblasti a aktivace může být specificky spuštěna pufrováním, výhodně v přítomnosti malých množství např. 20 mM CaCl_2 do neutrální až slabě bazické oblasti pH. Aktivace může být zastavena změnou pH, znovu do silně kyselé oblasti. Trypsin může být například purifikován ionexovou chromatografií na takovém ionexu, jako SP-Sepharosa®XL nebo benzamidin-Sepharosa.

Za účelem purifikovat produkt exprese z kultivačního média může být kultivační supernatant prvně oddělen od buněk, jak je popsáno v příkladu 6.1. Následná purifikace zahrnující autokatalytickou aktivaci trypsinogenu je výhodně provedena vhodnými chromatografickými purifikačními postupy. V zejména přednostní formě je provedena chromatografie, jak je popsáno v příkladu 6.2, bez předcházející separace buněk, kde ke kultivačnímu médiu, stále obsahujícímu buňky, je přidán pufr, obsahující vápenaté ionty, o finální koncentraci vápníku 1-30 mM. Následně jsou provedeny kroky (c), (d) a dle volby (e) způsobu podle vynálezu například, využívající vhodné chromatografické purifikační postupy a krok pufrování, pro autokatalytické štěpení produktu exprese.

Zejména přednostní forma způsobu podle vynálezu je tedy charakterizována:

- a) Transformováním hostitelské buňky rekombinantní nukleovou kyselinou, která kóduje zymogenní prekursorový trypsinogen z prasete, který je fúzován se signální peptidovou sekvencí a obsahuje propeptid, který je zkrácen na rozpoznávací místo enterokinasy, kde toto štěpné místo je štěpeno rekombinantním trypsinem nebo je štěpeno autokatalyticky za určitých pufovacích podmínek a zkrácený trypsinogen může být v tomto postupu štěpen za vytvoření aktivního trypsinu,
- b) Kultivováním hostitelské buňky během fáze exprese při kyselém pH, výhodně pH 3-4 tak, že zkrácený trypsinogen je přítomen v rozpustné formě a je sekretován do kultivačního média ale autokatalytické aktivaci je do značné míry zabráněno,
- c) Izolací zkráceného rekombinantního trypsinogenu z kultivačního supernatantu a jeho aktivací za podmínek, které dovolují účinné štěpení zkráceného trypsinogenu rekombinantním trypsinem nebo autokatalytickým štěpením a
- d) Dle volby oddělením neštěpených molekul trypsinogenu od aktivního trypsinu.

Zkrácení propeptidu popsané v tomto vynálezu má pozitivní účinek zejména na expresi a autokatalytickou aktivaci. Kromě toho, po autokatalytické aktivaci se nežádoucí, další autolýza zvyšuje značně při $\text{pH} > 4,0$ během růstové fáze a expresní fáze kultury.

Další zvýšení ve výtěžku exprese ve způsobu podle vynálezu může být dosaženo transformováním hostitelské buňky několika vektory, kde každý z nich obsahuje rekombinantní nukleovou kyselinu, jak je uvedeno výše, kde vektory obsahují různé selekční markery, např. Zeocin a G418. Kultivace za násobných selekčních podmínek překvapivě dovoluje, aby se dále podstatně zvýšil výtěžek exprese rekombinantního trypsinogenu.

Dalším předmětem vynálezu je rekombinantní nukleová kyselina, která kóduje trypsinogen, který má rozpoznávací místo pro enterokinasu v propeptidové sekvenci, kde propeptidová sekvence je vzhledem k přirozené propeptidové sekvenci zkrácena a je výhodně fúzována se signální peptidovou sekvencí. Zkrácená propeptidová sekvence podle vynálezu výhodně sestává z rozpoznávacího místa pro enterokinasu, které má aminokyselinovou sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys a dle volby má až 5 dalších aminokyselin, umístěných na jeho N-konci. Nukleová kyselina podle vynálezu má zejména výhodně nukleotidovou sekvenci, ukázanou v SEQ ID NO.22.

Nukleová kyselina podle vynálezu je výhodně v operačním spojení s regulovatelnou sekvencí kontrolované exprese, což je například vhodná sekvence kontrolované exprese pro expresi genu v kvasinkových buňkách, taková jako AOX1 promotor z *Pichia pastoris*.

Vynález se také týká rekombinantního vektoru, který obsahuje alespoň jednu kopii rekombinantní nukleové kyseliny, jak je uvedeno výše. Vektor je výhodně takový vektor, který je vhodný pro expresi genu v kvasinkových buňkách. Příklady takových vektorů jsou popsány v Sambrook et al., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Kromě rekombinantní nukleové kyseliny obsahuje vektor další vhodné genetické prvky pro případné zamýšlené použití a zejména gen pro selekční marker. Zejména výhodně použité jsou vektory, které mohou být v buňce přítomny v násobných kopiích, zejména vektory, které mohou být integrovány v mnohonásobné formě do genomu hostitelské buňky. Vynález se také týká kombinací vektorů, kde každý z nich obsahuje gen pro různý selekční marker a které mohou být současně propagovány v hostitelské buňce.

Kromě toho, se vynález týká rekombinantní buňky, která je

transformována nukleovou kyselinou podle vynálezu nebo vektorem podle vynálezu. Rekombinantní buňka je výhodně kvasinková buňka, zejména methylotrófní kvasinková buňka, taková, jako *Pichia pastoris* nebo *Hansenula polymorpha*.

Nakonec se vynález týká rekombinantního trypsinogenu, který je kódován nukleovou kyselinou podle vynálezu. Rekombinantní trypsinogen má propeptidovou sekvenci, která je ve srovnání s přirozenou propeptidovou sekvencí zkrácena a obsahuje rozpoznávací místo pro enterokinasu. Rekombinantní trypsinogen podle vynálezu má výhodně aminokyselinovou sekvenci, ukázanou v SEQ ID NO. 23.

Předkládaný vynález je také objasněn následujícími obrázky a příklady.

Obrázek 1: ukazuje plasmidovou mapu expresního plasmidu pTRYP-9, obsahujícího kompletní rekombinantní trypsinogen,

Obrázek 2: ukazuje plasmidovou mapu expresního plasmidu pTRYP-11 obsahujícího zkrácený rekombinantní trypsinogen (sh-trypsinogen) a gen markeru pro rezistenci k Zeocinu (ZeoR),

Obrázek 3: ukazuje plasmidovou mapu expresního plasmidu pTRYP-13 obsahujícího zkrácený rekombinantní trypsinogen (sh-trypsinogen) a gen markeru (KanR) pro rezistenci ke kanamycinu / G418.

Příklady:

Způsoby:

Techniky rekombinantní DNA

Pro manipulaci s DNA byly použity standardní způsoby, jak je popsáno v Sambrook, J. et al. (1989) v Molecular Cloning: A

Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Molekulárně-biologické reagenty byly použity podle návodů výrobce.

Stanovení proteinu

Stanovení proteinu purifikovaného trypsinu bylo provedeno měřením absorbance při 280 nm. Hodnota 13,6 byla použita pro A 1 % / 280 nm pro 1 cm silnou kyvetu.

Výpočet:

$$\text{Protein [mg/ml]} = (10 \text{ [mg/ml]} * \Delta A_{\text{vzorek}} * \text{ředění}) / 13,6$$

Pichia pastoris a expresní vektory pro Pichia pastoris

Pro zacházení s Pichia pastoris a expresními vektory byly jako instrukce použity katalogy a instrukční manuály od Invitrogenu. Vektory pro exprese zkráceného rekombinantního trypsinogenu jsou založeny na vektorech pPICZαA a pPIC9K od Invitrogenu.

Příklad 1:

Syntéza genu kompletního rekombinantního trypsinogenu s využitím optimalizovaných kodonů pro expresi v kvasinkách

Jedním z přednostních způsobů pro provedení způsobu podle vynálezu je syntetizovat kodonově optimalizovanou sekvenci genu. Za účelem optimalizovat každý kodón pro expresi v kvasinkách, bylo nezbytné provést kompletní de novo syntézu genu o cca 700 pb, který kóduje kompletní rekombinantní trypsinogen. Bylo-li to nutné, bylo možné optimalizovat každý kodón využitím degenerativního kódu v opětovné translaci sekvence aminokyseliny prasečího trypsinogenu podle SEQ ID NO. 1. Pro tento účel byl gen rozdělen do 18 oligonukleotidů, které byly dlouhé 54 až 90 nukleotidů. Oligonukleotidy byly navrženy tak, že střídavě sekvence fragmentů kódujícího řetězce a komplementárního vlákna, jejichž 5' a 3' konce se navzájem komplementárně překrývají se sousedními oligonukleotidy. Překrývající se oblast byla vybrána

v každém případě takovým způsobem, aby se do značné míry zabránilo nespecifické vazbě během reakce rozpoznávání v následné PCR reakci. Oligonukleotidy na 5' a 3' konci genu byly poskytnuty proti směru a po směru kódující oblasti s rozpoznávacími místy pro restriční endonukleasy, které by mohly být použity pro pozdější inzerci syntetického genu podle SEQ ID NO.2 do expresních vektorů. Takto bylo tedy proti směru vloženo rozpoznávací místo pro restriční endonukleasu EcoRI a po směru bylo vloženo rozpoznávací místo pro restriční endonukleasu XbaI. Sekvence oligonukleotidů jsou ukázány v SEQ ID NO.3 až 20.

Syntéza genu byla provedena pomocí PCR reakce. Kódující oblast byla proto prvně rozdělena do tří segmentů (oligonukleotidy 3 až 8, 9 až 14, 15 až 20) a tyto segmenty byly vytvořeny v oddělených PCR reakcích, použitím překrývajících se komplementárních oligonukleotidů. V tomto postupu byl fragment genu v každém kroku prodloužen až do té doby, kdy byl vytvořen produkt celkové délky, který byl amplifikován v následujících cyklech. Teplota připojení byla vybrána podle překrývajících se oblastí s nejnižším bodem tání.

Tyto tři segmenty byly následně analyzovány pomocí elektroforézy v agarosovém gelu, produkty, které měly očekávanou délku byly izolovány z gelu použitím QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) a byly syntetizovány za vytvoření kompletního genového produktu v další PCR reakci. Prvních 5 cyklů byly PCR reakce provedeny bez přídavku primeru na 5' konci a 3' konci celého genu, takže ze začátku bylo z těchto tří segmentů tvořeno několik fragmentů genového produktu o očekávané délce. Teplota připojení byla vybrána podle překrývajících se oblastí s nejnižším bodem tání. Poté byly přidány koncové primery a teplota připojení byla zvýšena podle teploty připojení primeru s nejnižší teplotou tání. Fragment genu očekávané délky byl amplifikován v dalších 25 cyklech. PCR fragment byl zkontrolován sekvenováním.

Příklad 2

Příprava zkráceného trypsinogenového genu

Kodóny prvních 20 aminokyselin přirozeně se vyskytujícího trypsinogenu byly odstraněny pomocí speciálně navrženého 5' primeru podle SEQ ID NO. 21 tak, aby jako N-koncová propeptidová sekvence zkráceného rekombinantního trypsinogenu zůstaly pouze kodóny rozpoznávací sekvence enteropeptidasy enterokinasy Asp-Asp-Asp-Asp-Lys a kodóny Glu-Phe, nutné pro klonování do expresních vektorů pro *Pichia pastoris*, kvůli rozpoznávacímu místu restriční endonukleasy EcoRI. Delece byla vnesena pomocí PCR reakce PCR fragmentu genu, kódujícího kompletní rekombinantní trypsinogen, použitím 5' primeru podle SEQ ID NO.21 a 3' primeru podle SEQ ID NO.20. DNA sekvence zkráceného rekombinantního trypsinogenu je ukázána v SEQ ID NO. 22 a aminokyselinová sekvence zkráceného rekombinantního trypsinogenu je ukázána v SEQ ID NO. 23.

Příklad 3

Klonování PCR fragmentů kompletního rekombinantního trypsinogenu, vytvořeného syntézou genu a klonování zkráceného rekombinantního trypsinogenu do expresních vektorů pro *Pichia pastoris*

PCR fragmenty byly znovu štěpeny EcoRI a XbaI (Roche Diagnostics GmbH), znovu izolovány (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) a následně byly ligovány do fragmentu expresního vektoru pPICZαA (Invitrogen), linearizovaného EcoRI a XbaI (Roche Diagnostics GmbH) a izolovaného QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen. Poté bylo pipetováno 1 µl (20 ng) fragmentu vektoru a 3 µl (100 ng) PCR fragmentu, 1 µl 10 x ligásového pufru (Sambrook et al., 1989 B.27), 1 µl T4 DNA ligasy, 4 µl sterilní H₂O_{redestilované}, směs byla opatrně promíchána a byla inkubována přes noc při 16°C. V tomto vektoru je syntetický gen pod kontrolou AOX 1 promotoru (promotor

pro alkoholoxidasu 1 z *Pichia pastoris*), který může být indukován methanolem (Mallinckrodt Baker B.V.) a je umístěn ve správném čtecím rámci za signálním peptidem α faktoru z *Saccharomyces cerevisiae*. Za účelem kontroly a izolace plasmidu, bylo 5 μ l ligační směsi poté transformováno do 200 μ l kompetentních buněk (Hanahan (1983) *E. coli* XLlBlue (Stratagene). Po 30 min inkubaci na ledu následoval teplotní šok (90 sek při 42°C). Následně byly buňky přeneseny do 1 ml LB média a byly inkubovány 1 hodinu při 37°C v LB médiu pro fenotypickou expresi. Alikvoty této transformace byly nanесeny na misky s LB médiem, za použití 100 μ g/ml Zeocinu, jako selekčního markeru a byly inkubovány 15 hodin při 37°C. Z narostlých kolonií byly izolovány plasmidy (Sambrook, J. et al. (1989) In. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) a byla ověřena bezchybnost sekvence bazí pomocí restriční analýzy a sekvenování. Expresní vektory vytvořené tímto způsobem, které obsahují syntetický gen pro kompletní rekombinantní trypsinogen nebo pro zkrácený rekombinantní trypsinogen, byly pojmenovány pTRYP-9 (viz obr. 1) a pTRYP-11 (viz obr. 2).

Transformace pTRYP-9 a pTRYP-11 do *Pichia pastoris*

Pro transformaci pTRYP-9 a pTRYP-11 do *Pichia pastoris* X-33, GS115 nebo KM71H s následnou integrací do genomu, byl vektor prvně linearizován SacI (Roche Diagnostics GmbH). Transformace byla provedena elektroporací, použitím Gene Pulser II (Biorad). Pro toto bylo kolonií *Pichia pastoris* inokulováno 5 ml YPD média (Invitrogen) a bylo inkubováno přes noc při 30°C za třepání. Pomocí této kultury narostlé přes noc bylo následně znovu inokulováno 200 ml čerstvého YPD média (Invitrogen) 1:2000 a bylo inkubováno za třepání přes noc při 30°C, dokud nebylo dosaženo OD₆₀₀ 1,3 až 1,5. Buňky byly poté odstředěny (1500 x g / 5 minut) a peleta byla resuspendována v 200 ml ledově studené, sterilní vodě (0°C). Buňky byly znovu odstředěny (1500 x g / 5

minut) a byly resuspendovány ve 100 ml ledově studené, sterilní vody (0°C). Buňky byly znovu odstředěny a resuspendovány v 10 ml ledově studeného (0°C) 1 M sorbitolu (ICN). Buňky byly znovu odstředěny a resuspendovány v 0,5 ml ledově studeného (0°C) 1 M sorbitolu (ICN). Takto izolované buňky byly uchovávány na ledu a ihned použity pro transformaci.

80 µl buněk bylo smícháno s cca. 1 µg linearizované pTRYP-9 nebo pTRYP-11 vektorové DNA a celá směs byla přenesena do ledově studené (0°C) elektroporační kyvety a byla inkubována na ledu po dalších 5 minut. Následně byla kyveta umístěna do Gene Pulser II (Biorad) a transformace byla prováděna při 1 kV, 1 kΩ a 25 µF. Po elektroporaci byla směs smíchána s 1 ml 1 M sorbitolu (ICN) a následně bylo 100 až 150 µl rozetřeno na misku s YPDS agarem (Invitrogen), obsahujícím 100 µg/ml Zeocinu (Invitrogen). Misky byly následně inkubovány 2-4 dny při 30°C.

Klony byly znovu inokulovány na miskách s rastrem MD (= minimální dextrosa) a dále analyzovány. Narostlé klony byly odebrány, resuspendovány ve 20 µl sterilní vody, lyzovány (1 hodinu, 30°C, 10 min, -80°C) 17,5 U lytikasy (Roche Diagnostics GmbH) a pomocí PCR byly přímo analyzovány, zda obsahují správně integrovanou trypsinogenovou expresní kazetu.

Klony, u kterých došlo během transformace k integraci kompletní expresní kazety do genomu, byly použity pro expresní experimenty.

Expresse kompletního a zkráceného rekombinantního trypsinogenu

Pozitivní klony byly inokulovány ve 3 ml BMGY média (Invitrogen) a inkubovány přes noc při 30°C za třepání. Následně bylo stanoveno OD při 600 nm a tyto klony byly znovu inokulovány v 10 ml BMMY média (Invitrogen) pH 3,0 tak, aby výsledné OD₆₀₀ bylo 1. BMMY médium (Invitrogen) pH 3,0 obsahuje methanol (Mallinckrodt Baker B.V.), který indukuje expresi kompletního nebo zkráceného

rekombinantního trypsinogenu, prostřednictvím AOX1 promotoru.

Kultivační nádoby byly za třepání inkubovány při 30°C, Každých 24 hodin byly odebírány vzorky, bylo stanoveno OD₆₀₀, pro kontrolu exprese, pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, byl odebrán alikvot kompletního a zkráceného rekombinantního trypsinogenu a každý byl doplněn 0,5 % methanolem (Mallinckrodt Baker B.V.) pro další indukci. Expresní experimenty byly prováděny po 72 hodin.

Analýza exprese kompletního a zkráceného rekombinantního trypsinogenu pomocí SDS elektroforézy v gelu

Z každé exprimující kultury bylo odebráno 500 µl, bylo stanoveno OD₆₀₀ a buňky byly odstředěny. Kultivační supernatant byl uložen a buněčná peleta byla kvůli lyzi resuspendována v příslušném množství Y-PER™ (50 až 300 µl/Pierce) pro OD₆₀₀ a byla třepána po 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následně byl lyzát odstředěn, aby se oddělily buněčné zbytky (15000 x g / 5 minut) a supernatant byl přenesen do čistých reakčních nádobek. 10 µl lyzátu a 10 µl kultivačního supernatantu bylo nanášeno na SDS polyakrylamidový gel a proteiny byly aplikováním elektrického pole rozděleny podle velikosti.

Překvapivě bylo možné identifikovat slabé zóny v kultivačních supernatantech klonů, obsahujících kompletní rekombinantní trypsinogen, stejně jako u klonů, obsahujících zkrácený rekombinantní trypsinogen, který se nevyskytoval v kontrolních klonech. Kontrolními klony se rozumí X33 buňky Pichia pastoris, které byly transformovány výchozím vektorem pPICZαA a které rostly a byly indukovány podobně, jako klony exprimující trypsinogen. Migrační vlastnosti nových proteinových zón v exprimujících klonech odpovídají vypočítané molekulové hmotnosti a je mírně vyšší než je molekulová hmotnost hovězího trypsinu, který byl nanášen jako kontrolní marker. Tato mírná

odlišnost ve velikosti naznačuje na neaktivovaný trypsinogen.

Překvapivě, rekombinantní zkrácený trypsinogen byl exprimován významně silněji než rekombinantní kompletní trypsinogen.

Příklad 4

Zvýšení výtěžku exprese násobnou transformací

Nejlepší klony z expresních experimentů s rekombinantním zkráceným trypsinogenem byly znovu připraveny pro elektroporaci, jak je popsáno výše, a byly znovu transformovány 1 µg linearizované pTRYP-11 vektorové DNA a transformační směs byla nanášena na misky s YPDS agarem (Invitrogen), obsahující 1000 až 2000 µg/ml Zeocinu (Invitrogen). Toto zvyšuje selekční tlak takovým způsobem, že rostou pouze ty klony, které mají ve svém genomu integrováno několik kopií expresního vektoru pTRYP-11 a tím také několik kopií příslušného genu pro rezistenci (v tomto případě pro Zeocin®). Protein zodpovědný za rezistenci k Zeocinu® je produkt bleomycinového genu ze *Streptoalloteichus hindustanus* (Calmels, T. et al., (1991); Drocourt, D. et al., (1990)), který váže Zeocin® ve stechiometrickém koncentračním poměru a tím tvoří buňku rezistentní k Zeocinu®. Čím vyšší je koncentrace Zeocinu® na miskách s YPDS agarem, tím vyšší množství proteinu, zajišťujícího rezistenci, musí být buňkou vytvořeno, aby umožnilo kvantitativně vázat Zeocin® a tím i růst. Toto je mezi jiným možné tehdy, když jsou v genomu integrovány násobné kopie genu pro rezistenci. Klony byly znovu inokulovány na MD miskách s rastrem, jak je popsáno výše.

Následně byly tyto klony ověřeny, zda exprimují a sekretují trypsinogen, jak je popsáno výše.

Překvapivě, bylo po tomto měření možné identifikovat klony, které měly značně zvýšený výtěžek exprese zkráceného rekombinantního trypsinogenu, sekretovaného do kultivačního supernatantu po

elektroforéze v SDS polyakrylamidovém gelu.

Příklad 5

Zvýšení výtěžku exprese použitím druhého selekčního tlaku

Zvýšení koncentrace Zeocinu® nad 2000 µg/ml nevedlo k zlepšení výtěžku exprese zkráceného rekombinantního trypsinogenu. Za účelem dále zvýšit počet kopií genu v expresních klonech genu podle SEQ ID NO. 22, který kóduje rekombinantní zkrácený trypsinogen a je kodónově optimalizován pro expresi v kvasinkách, byly integrovány další expresní vektory do genomu expresních klonů, připravených v příkladech 3 a 4, které mají nejvyšší výtěžek exprese prostřednictvím druhého selekčního tlaku, výhodně G418 (Roche Diagnostics GmbH).

Pro tento účel je expresní kazeta z pTRYP-11, obsahující část AOX1 promotoru, gen pro signální peptid α faktoru *Saccharomyces cerevisiae*, kodónově optimalizovaný gen pro rekombinantní zkrácený trypsinogen podle SEQ ID NO.22, vyštěpena restričními endonukleasami SacI a XbaI z pTRYP-11, restriční směs je rozdělena na 1 % agarosovém gelu a z gelu je izolován fragment o 1693 pb (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen). Současně byl pomocí SacI a NotI štěpen vektor pPIC9K (Invitrogen), restriční směs byla rozdělena na 1 % agarosovém gelu a z gelu byl izolován fragment vektoru o 8956 pb (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen). XbaI přechnívající fragment z pTRYP-11 a NotI přechnívající fragment z pPIC9K byly doplněny pomocí Klenowovy polymerasy (Roche Diagnostics GmbH), za vytvoření tupých konců, podle návodu výrobce.

Následně, dva fragmenty získané tímto způsobem, byly ligovány, jak je popsáno výše. Ligační směsí byla transformována *E. coli* XL1 Blue (Stratagene), jak je popsáno výše (klony obsahující plasmid byly selektovány na miskách s 100 µg/ml ampicilinu na miskách s živným médiem) a tyto klony byly pomocí restričních

analýz a sekvenování ověřeny. Expresní vektor, vytvořený tímto způsobem, byl pojmenován pTRYP-13 (viz obr. 3).

Integrace expresního vektoru pTRYP-13 do genomu *Pichia pastoris* byla selektována prostřednictvím G418 (Roche Diagnostics GmbH).

Klony, které měly nejvyšší výtěžek exprese trypsinogenu z násobné transformace s pTRYP-11 (Zeocinová rezistence) byly připraveny pro elektroporaci, jak je popsáno výše a transformovány 1 µg fragmentu vektoru pTRYP-13 (G418 rezistence), linearizovaným SalI (Roche Diagnostics GmbH). Transformační směs byla následně uložena na 1 až 3 dny při 4°C v 1 M sorbitolu (ICN) (pro vytvoření G418 rezistence), poté bylo 100 až 200 µl nanášeno na misky s YPD (Invitrogen), obsahující 1, 2 a 4 mg/ml G418 (Roche Diagnostics GmbH) a inkubovány 3 až 5 dnů při 30°C. Výsledné klony, výhodně z misek s YPD s nejvyšší koncentrací G418, byly znovu testovány na zvýšení exprese zkráceného rekombinantního trypsinogenu, použitím SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, jak je popsáno výše.

Po tomto postupu bylo překvapivě možno znovu identifikovat klony, které vykazují zvýšený výtěžek exprese zkráceného rekombinantního trypsinogenu v kultivačním supernatantu po SDS elektroforéze v polyakrylamidovém gelu.

Příklad 6

Izolace trypsinogenu z kultivačního supernatantu a aktivace

6.1

Kultivační supernatant byl od buněk oddělen pomocí mikrofiltrace, centrifugace nebo filtrace. Trypsinogen byl purifikován pomocí chromatografie na fenyl Sepharose fast flow (Pharmacia). Chromatografie byla provedena v oblasti pH 2-4. Autokatalytická aktivace byla spuštěna pufrováním pH na 7-8 v přítomnosti 20 mM CaCl₂. Tato autokatalytická aktivace může být zastavena opětovnou změnou pH zpět do oblasti 2-4. Aktivní trypsin byl purifikován

chromatografií na benzamidinové Sepharose (např. SP-Sepharose®XL, ff) (Pharmacia/package insert) nebo na ionexu. Trypsin je skladován při pH 1,5-3, aby se zabránilo autolyzi. Specifická aktivita purifikovaného trypsinu je 180-200 U/mg proteinu.

6.2

Celé fermentační médium je naředěno v poměru přibližně 1:2 až 1:4 pufrém octanu amonného (5-20 mM) obsahujícího 5-30 mM chloridu vápenatého, pH 3,5 a purifikováno prostřednictvím chromatografie na expandovaném loži (expanded bed chromatography; McCornick (1993); EP 0 699 687) použitím kationtového iontoměniče (např. Streamline®SP, XL). V tomto případě byla chromatografie provedena za přítomnosti buněk. Buňky jsou současně rozděleny pomocí chromatografie. Následuje postup, který je popsán v příkladu 6,1 (pufrování/aktivace atd.).

Příklad 7

Stanovení aktivity

Aktivita trypsinu byla stanovena použitím Chromozym TRY (Pentapharm Ltd) ve 100 mM Tris pH 8,0, 20 mM CaCl_2 při 25°C. Fotometrické měření je provedeno při 405 nm.

Zkratky:

YPD:	kvasničný dextrosový pepton
YPDS:	kvasničný dextrosový sorbitolový pepton
BMGY:	pufrované glycerolové komplexní médium
BMMY:	pufrované methanolové komplexní médium
SDS:	dodecylsulfát sodný

Seznam literárních citací:

- Bricteuz-Gregoire, Schyns R., Florkin M (1966) Biochim. Biophys. Acta **127**: pp 277
- Calmels T., Parriche M., Durand H., Tiraby G. (1991), Curr. Genet. **20**: pp 309
- Charles M., Rovey M., Guidoni A., Desnuelle P. (1963) Biochim. Biophys. Acta **69**: pp 115-129
- Desnuelle P. (1959)
Enzymes 2nd Edition vol 4 Editor Boyer, Acad. Press NY. pp. 119
- Drocourt, D., Calmels T., Reynes J.P., Baron M., Tiraby G. (1990), Nucleic Acid Research **18**: pp 4009
- Graf L., Craik C.S., Patthy A., Roczniak S., Fletterick R.J., Rutter W.J. (1987) Biochem. **26**: pp. 2616
- Graf L., Jancso A., Szilagyi L., Hegyi G., Pinter K., Naray-Szabo G., Hepp J., Mehzihradszky K., Rutter W.J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA **85**, pp 4961
- Hanahan (1983)
J. Mol. Biol., **166**: pp 557
- Higaki J.N., Evnin L.B., Craik C.S. (1989) Biochem. **28**: pp 9256
- Hedstrom L., Szilagyi L., Rutter W.J. (1992) Science **255**: pp 1249
- Jurasek L., Fackre D. Smillie L.B. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun **37**: pp. 99
- Keil B. (1971)
The Enzymes Vol II, 3rd Edition, Editor Boyer, Acad. Press N.Y. pp 249-275

- Light A., Savithari H.S., Liepnieks J.J. (1980) Analytical Biochemistry **106**: pp 199-206
- McCornick, D.K., Bio/Technol. 11 (1993), 1059; Expanded Bed Absorption, Principles and Methods, Amersham Pharmacia Biotech, Edition AB, ISBN 91-630-5519-8;
- Moriyama K. and Tszuzuki J. (1969) Arch Biochem Biophys 126: pp 971
- Northrop J.H., Kunitz M., Herriott R. (1948)
Crystalline Enzymes, 2nd Edition, Columbia Univ. Press NY
- Ryan C.A. (1965)
Arch Biochem Biophys 110: pp 169
- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)
In. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
Cold Spring Harbor, New York
- Travis J. (1968)
Biochem Biophys Res Commun. 30: pp 730
- Travis J. and Roberts R.C. (1969) Biochemistry 8: pp 2884
- Trop M. and Birk Y. (1968) Biochem. J. 109: pp 475
- Wahlby S. and Engstrom L. (1968) Biochim. Biophys. Acta **151**: pp 402
- Vasquez, J.R., Evnin L.B., Higaki J.N. Craik C.S. (1989) J. Cell. Biochem. 39: pp. 265
- Wahlby S. (1968)

Biochim. Biophys. Acta 151: pp 394

Willetts, W.S., Gillmor S.A., Perona J.J., Fletterick R.J., Craik C.S. (1995) Biochem. 34: pp 2172

Yee, L. and Blanch, H.W., (1993) Biotechnol. Bioeng. 41: pp. 781-790

WO 97/00316 (NOVO NORDISK AS/Wöldike Helle, Kjeldsen Thomas) A PROCESS FOR PRODUCING TRYPSIN

WO 99/10503 (ROCHE DIAGNOSTICS/Kopetzki Ehrhard, Hopfher Karl-Peter, Bode Wolfram, Huber Robert)

ZYMOGENIC PROTEASE PREKURSOR THAT CAN BE AUTOKATALYTICALLY ACTIVATED AND THEIR USE.

WO 00/17332 (ELI LILLY AND COMPANY/Hanquier Jose Michael, Hersherberger Charles Lee, Desplancq Dominique, Larson Jeffrey) PRODUCTION OF SOLUBLE RECOMBINANT TRYPSINOGEN ANALOGS

WO 01/55429 (POLYMUN SCIENTIFIC IMMUNBIOLOGISCHE FORSCHUNG GMBH/Mattanovich Diethard, Katinger Hermann, Hohenblum Hubertus, Naschberger Stefan, Weik Robert) METHOD FOR THE MANUFACTURE RECOMBINANT TRYPSIN

EP 0 597 681 (ELI LILLY AND COMPANY/Greaney Michael Gerard, Rostech Paul Robert) EXPRESSION VECTORS FOR THE BOVINE TRYPSIN AND TRYPSINOGEN AND HOST CELLS TRANSFORMED THEREWITH

EP 0 699 687 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION/Noda Munehiro, Sumi Akinori, Ohmura Takao, Yokoyama Kazmasa) PROCESS FOR PURIFYING RECOMBINANT HUMAN SERUM ALBUMIN

Patentové nároky

1. Způsob rekombinantní produkce trypsinu, zahrnující kroky:
 - a) transformování hostitelské buňky rekombinantní nukleovou kyselinou, která kóduje trypsinogen s rozpoznávacím místem pro enterokinasu v propeptidové sekvenci ve formě, která může být sekretována hostitelskou buňkou,
 - b) kultivaci hostitelské buňky za podmínek, které umožňují expresi rekombinantní nukleové kyseliny a sekreci produktu exprese do kultivačního média, podmínky byly vybrány tak, že je do značné míry zabráněno autokatalytickému štěpení propeptidové sekvence,
 - c) izolace produktu exprese z kultivačního média,
 - d) štěpení propeptidové sekvence za vytvoření aktivního trypsinu a
 - e) dle volby oddělení neštěpených molekul trypsinogenu od aktivního trypsinu.
2. Způsob, jak je nárokováno v patentovém nároku 1, **charakterizovaný tím, že,**
jako hostitelská buňka je použita kvasinková buňka.
3. Způsob, jak je nárokováno v patentovém nároku 1 nebo 2, **charakterizovaný tím, že**
jako hostitelská buňka je použita *Pichia pastoris* nebo *Hansenula polymorpha*.
4. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 3, **charakterizovaný tím, že**
je použita rekombinantní nukleová kyselina, která kóduje trypsinogen fúzovaný k signálnímu peptidu, který zprostředkovává sekreci.

5. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 4,
charakterizovaný tím, že
je použita rekombinantní nukleová kyselina s optimalizovaným využitím kodónů pro hostitelskou buňku.
6. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 5,
charakterizovaný tím, že
je použita rekombinantní nukleová kyselina, která kóduje trypsinogen, který má zkrácenou propeptidovou sekvenci.
7. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 6,
charakterizovaný tím, že
je použita rekombinantní nukleová kyselina, která kóduje prasečí trypsinogen.
8. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 7,
charakterizovaný tím, že
je použita rekombinantní nukleová kyselina, která má nukleotidovou sekvenci, ukázanou v SEQ ID NO. 22.
9. Způsob jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 8,
charakterizovaný tím, že
rekombinantní nukleová kyselina je exprimována za kyselých podmínek, zejména při pH 3-4.
10. Způsob jak je nárokováno v patentovém nároku 9,
charakterizovaný tím, že
hostitelská buňka je kultivována před expresí rekombinantní nukleové kyseliny za podmínek, které jsou zejména optimální pro růst hostitelské buňky.

11. Způsob, jak je nárokováno v patentovém nároku 10,
charakterizovaný tím, že
hostitelská buňka je kultivována před expresí rekombinantní nukleové kyseliny při pH 5 - 7 až do předem stanovené optické denzity a poté je exprese rekombinantní nukleové kyseliny indukována.
12. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 11,
charakterizovaný tím, že
propeptidová sekvence je štěpena přidavkem rekombinantního trypsinu anebo autokatalytickým štěpením.
13. Způsob, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 1 až 12,
charakterizovaný tím, že
kultivační médium, obsahující hostitelské buňky, je smícháno s pufrem, obsahujícím vápenaté ionty a následně jsou provedeny kroky (c), (d) a dle volby (e).
14. Rekombinantní nukleová kyselina, která kóduje trypsinogen, který má rozpoznávací místo pro enterokinasu v propeptidové sekvenci,
charakterizovaná tím, že
propeptidová sekvence je ve srovnání s přirozenou propeptidovou sekvencí zkrácena.
15. Nukleová kyselina, jak je nárokováno v patentovém nároku 14,
charakterizovaná tím, že
propeptidová sekvence sestává z rozpoznávacího místa pro enterokinasu, které má aminokyselinovou sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys a dle volby až z 5 dalších aminokyselin, umístěných na jejím N-konci.

16. Nukleová kyselina, jak je nárokováno v patentovém nároku 14 nebo 15,
charakterizovaná tím, že
má nukleotidovou sekvenci, ukázanou v SEQ ID NO. 22.
17. Nukleová kyselina, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 14 až 16,
charakterizovaná tím, že
je v účinném spojení se sekvencí regulovatelné kontroly exprese.
18. Rekombinantní vektor,
charakterizovaný tím, že
obsahuje alespoň jednu kopii rekombinantní nukleové kyseliny, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 14 až 17.
19. Rekombinantní buňka,
charakterizovaná tím, že
je transformovaná nukleovou kyselinou, jak je nárokováno v jednom z patentových nároků 14 až 17 nebo vektorem, jak je nárokováno v patentovém nároku 18.
20. Rekombinantní trypsinogen,
charakterizovaný tím, že
má propeptidovou sekvenci, která je ve srovnání s přirozenou propeptidovou sekvencí zkrácena a obsahuje rozpoznávací místo pro enterokinasu.
21. Trypsinogen, jak je nárokováno v patentovém nároku 20,
charakterizovaný tím, že
propeptidová sekvence sestává z rozpoznávacího místa pro enterokinasu, které má aminokyselinovou sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys a dle volby až z 5 dalších aminokyselin, umístěných na jejím N-konci.

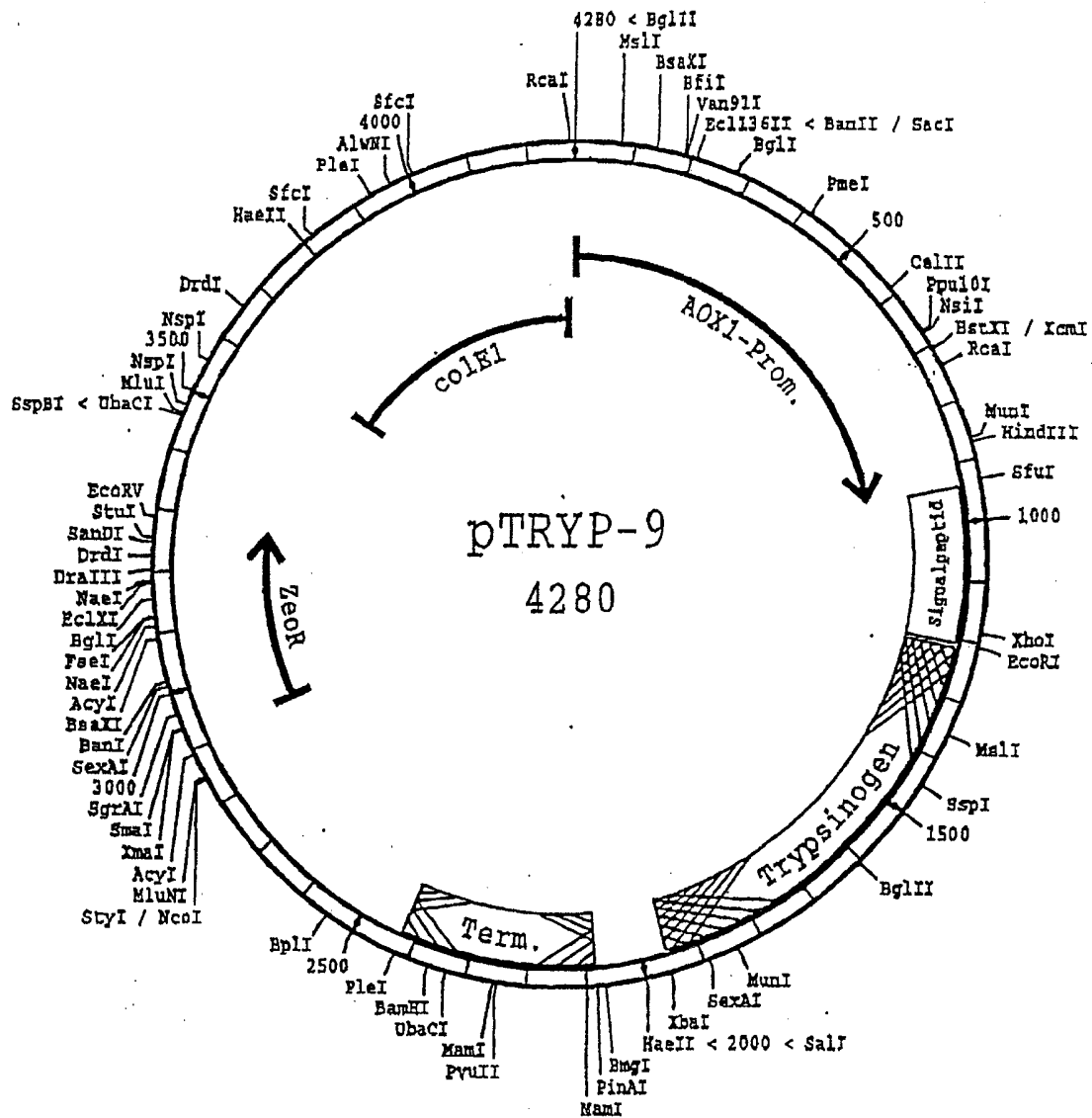
22. Trypsinogen, jak je nárokováno v patentovém nároku 20 nebo 21,
charakterizovaný tím, že
má aminokyselinovou sekvenci ukázanou v SEQ ID NO. 23.

19.01.04

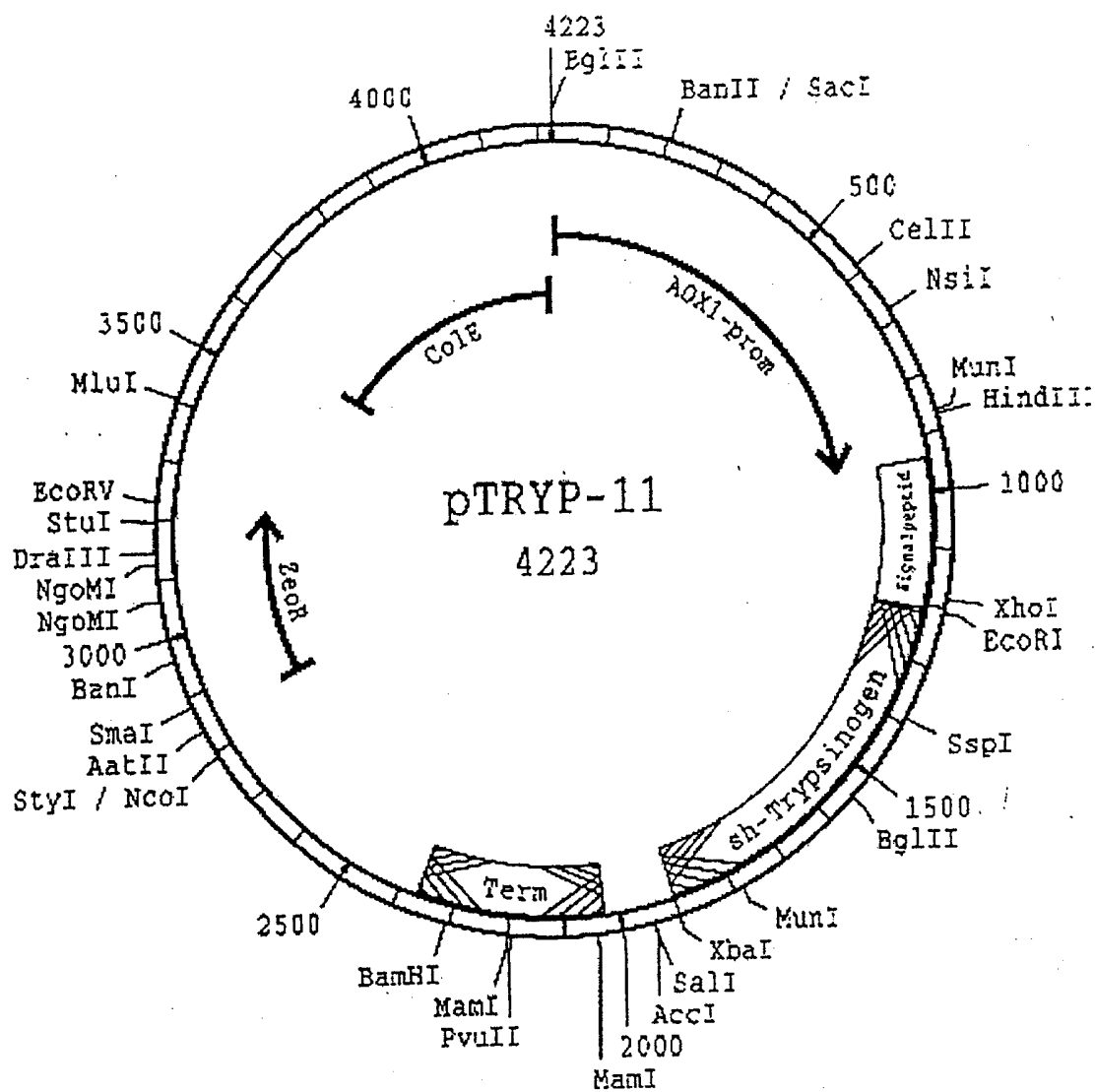
PV 2403-2337

1774

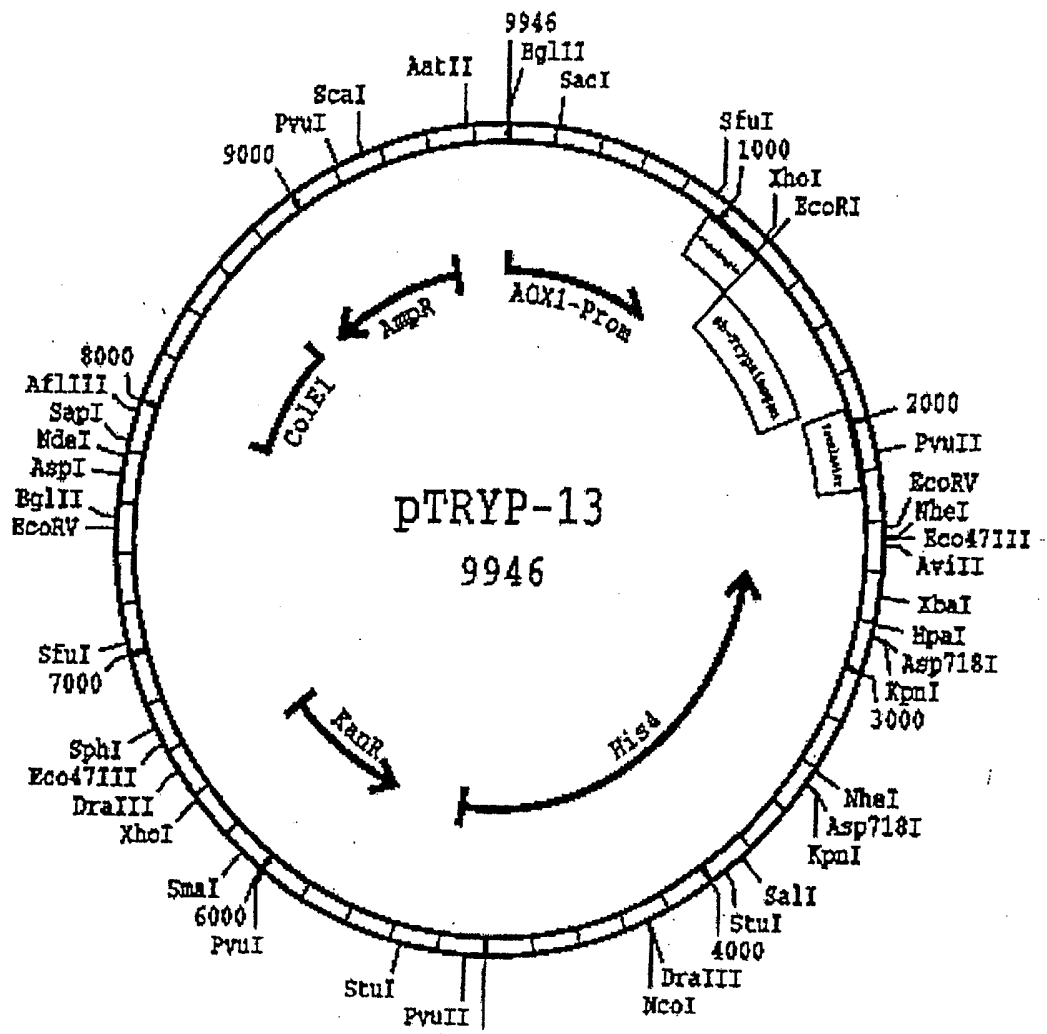
Obr. 1



Obrázek 2



Obrázek 3



19.01.04

PV 2003-2534

~~177~~

Seznam sekvencí

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Způsob produkce rekombinantního trypsinu

<130> 5515/00/EP

<140>

<141>

<150> 01102342.1

<151> 2001-02-01

<160> 23

<170> Patentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 247

<212> PRT

<213> Porc

<400> 1

Ile Pro Asn Thr Phe Val Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ala Ala Val Ala

1 5 10 15

Phe Pro Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ala

20 25 30

Ala Asn Ser Ile Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Ser His Phe

35 40 45

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His

50 55 60

Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Asp

65 70 75 80

Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Thr

85 90 95

His Pro Asn Phe Asn Gly Asn Thr Leu Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile

100 105 110

Lys Leu Ser Ser Pro Ala Thr Leu Asn Ser Arg Val Ala Thr Val Ser

$\langle 210 \rangle$ 2

<212> DNA

 $\langle 220 \rangle$

<400> 2

gatgatgata aaattgttgg tggttatact tgtgctgcta attctattcc atatcaag
tt 120

tctttaaatt ctggttctca tttttgtggt gggtctttga ttaattctca atggggtt
tt 180

tctgctgctc attgttacaa atcaagaatc caagttagat tgggtgaaca taatattg
at 240

gttttggaag gtaatgaaca atttattaat gctgctaaaa ttattactca tccaaatt
tt 300

aatggtaata ctttggataa tgatattatg ttgattaaat tgtcttctcc agctactt
ta 360

aattcaagag ttgctactgt ttctttgccca agatcttggtg ctgctgctgg tactgaat
gt 420

ttgatttctg gttggggtaa tactaaatct tctgggttctt cttatccatc tttgttgc
aa 480

tgtttgaaag ctccagtttt gtctgattct tcttgtaaata cttcttacct aggtcaaa
tt 540

actggtaata tgatttgtgt tgggttttttg gaagggtgga aagattcttg tcaagggtg
at 600

tctggtggtc cagttgtttg taatggtcaa ttgcaaggta ttgtttcttg gggttatg
gt 660

tgtgctcaaa aaaataaacc aggtgtttac actaaagttt gtaattatgt taattgga
tt 720

caacaaacta ttgctgctaa ttag
744

<210> 3

<211> 56

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 3

gcggaattca ttccaaatac ttttgttttg ttggctttgt tgggtgctgc tgttgc
56

<210> 4

<211> 54

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 4

ccaccaacaa ttttatcatc atcatcagtt ggaaaagcaa cagcagcacc caac
54

<210> 5

<211> 62

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 5

gatgataaaa ttgttggtgg ttatacttgt gctgctaatt ctattccata tcaagttt
ct 60
tt
62

<210> 6

<211> 64

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 6

gaattaatca aagaaccacc acaaaaatga gaaccagaat ttaaagaaac ttgatatg
ga 60
atag 64

<210> 7

<211> 64

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 7

ggtgggttctt tgattaattc tcaatgggtt gtttctgctg ctcattgtta caaatcaa
ga 60
atcc 64

<210> 8

<211> 62

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 8

cottccaaaa catcaatatt atgttcaccc aatctaactt ggattcttga tttgtaac
aa 60
tg
62

<210> 9

<211> 63

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 9

taatattgat gttttggaag gtaatgaaca atttattaat gctgctaaaa ttattact

ca. 60

tcc

63

<210> 10

<211> 62

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 10

caacataata tcattatcca aagtattacc attaaaattt ggatgagtaa taatttta

gc 60

ga

62

<210> 11

<211> 64

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 11

ctttggataa tgatattatg ttgattaaat tgtcttctcc agctacttta aattcaag

ag 60

ttgc

64

<210> 12

<211> 58

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 12

ccagcagcag cacaagatct tggcaaagaa acagtagcaa ctcttgaatt taaagtag
58

<210> 13

<211> 61

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 13

cttgtgctgc tgctggtact gaatgtttga tttctggttg gggtaataact aaatcttc
tg 60
g
61

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 14

gagctttcaa acattgcaac aaagatggat aagaagaacc agaagattta gtattacc
58

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 15

gttgcaatgt ttgaaagctc cagttttgtc tgattcttct tgtaaattctt cttaccca
gg 60

<210> 16

<211> 59

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 16

ccaaaaaacc aacacaaatc atattaccag taatttgacc tgggtaagaa gatttaca
a 59

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 17

gatttgtgtt gggttttttg aaggtggtaa agattcttgt caaggtgatt ctggtggt
cc 60

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 18

ccaagaaaca ataccttgca attgaccatt acaaacaact ggaccaccag aatcacc
57

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 19

gcaaggtatt gtttcttggg gttatggttg tgctcaaaaa aataaaccag g
51

<210> 20

<211> 90

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 20

gcgtctagac taattagcag caatagtttg ttgaatccaa ttaacataat tacaaact
tt 60

agtgtaaaca cctggtttat ttttttgagc

90

<210> 21

<211> 48

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 21

ccgggaattc gatgatgatg ataaaattgt tgggtggttat acttgtgc

48

<210> 22

<211> 687

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Syntetický gen

<400> 22

gatgatgatg ataaaattgt tgggtggttat acttgtgctg ctaattctat tccatatac
aa 60

gtttctttaa attctggttc tcatttttgt ggtggttctt tgattaattc tcaatggg
tt 120

gtttctgctg ctcatgtta caaatcaaga atccaagtta gattgggtga acataata
tt 180

gatgttttgg aaggtaatga acaatttatt aatgctgcta aaattattac tcatccaa
at 240

tttaatggta atactttgga taatgatatt atgttgatta aattgtcttc tccagcta
ct 300

ttaaattcaa gagttgctac tgtttctttg ccaagatctt gtgctgctgc tggtagtg
aa 360

tgtttgattt ctggttgggg taatactaaa tcttctgggtt cttcttatcc atctttgt
tg 420

caatgtttga aagctccagt tttgtctgat tcttcttgta aatcttctta cccaggtc
aa 480

attactggta atatgatttg tggttggtttt ttggaagggtg gtaaagattc ttgtcaag
gt 540

gattctgggtg gtccagttgt ttgtaatggt caattgcaag gtattgtttc ttgggggtt
at 600

ggttggtgctc aaaaaaataa accaggtggt tacactaaag tttgtaatta tggttaatt
gg 660

attcaacaaa ctattgctgc taattag
687

<210> 23

<211> 228

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Zkrácený trypsinogen

<400> 23

Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ala Ala Asn Ser
1 5 10 15

Ile Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Ser His Phe Cys Gly Gly
20 25 30

Ser Leu Ile Asn Ser Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys
35 40 45

Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Asp Val Leu Glu
50 55 60

Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Thr His Pro Asn
65 70 75 80

Phe Asn Gly Asn Thr Leu Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys Leu Ser
85 90 95

Ser Pro Ala Thr Leu Asn Ser Arg Val Ala Thr Val Ser Leu Pro Arg
100 105 110

Ser Cys Ala Ala Ala Gly Thr Glu Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn
115 120 125

Thr Lys Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Gln Cys Leu Lys
130 135 140

Ala Pro Val Leu Ser Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ser Tyr Pro Gly Gln

225