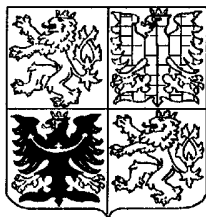


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 03.08.95
(32) 05.08.94
(31) 94/940432
(33) HR
(40) 14.02.96

(21) 1999-95

(13) A3

6(51)

C 12 N 15/11
C 12 N 15/17
C 12 P 21/04
C 07 K 14/62
C 07 K 14/65
C 07 K 2/00
C 07 H 21/04

(71) PLIVA, farmaceutska, kemijska, prehrambena i kozmetička industrija, dioničko društvo, Zagreb, HR;

(72) Meštric Silvija, Zagreb, HR;
Punt Peter J., Pijnacker, NL;
Valinger Radovan, Zagreb, HR;
van den Hondel Cees A.M.J.J., Gouda, NL;

(54) DNA sekvence kodující nové biosyntetické prokursory insulinu a postup přípravy insulinu

(57) Předmětem vynálezu jsou DNA sekvence kodující nové biosyntetické prekursory insulinu a použití kultivovaných eukaryotických buněk, zvláště buněk plísní *Aspergillus* sp., k přípravě insulinu. Cíle se dosahuje sekvencí DNA zahrnující kodující sekvenci pro insulinový prekursor vzorce B-Pg-A, kde B a A reprezentují řetězec B resp. řetězec A a kde Pg reprezentuje modifikovaný C-peptid nebo jakýkoli počet aminokyselin obsahující přinejmenším jedno konsensus místo N-glykosylace. Pg, spojující řetězce B a A, obsahuje signál proteolytického zpracování nebo místo specifického chemického štěpení. Výhodné je modifikovat proinsulinový gen vytvořením glykosylačního místa AsnXSer. Vynález je založen na zjištění, že výtěžek imunoreaktivního insulinu, měřený metodou RIA, je daleko nejlepší u transformanta získaného transformací vektorem, v němž lidský proinsulinový gen, fúzovaný s genem glukamylasové chránící bílkoviny, nese konsensus místo N-glykosylace. Vynález se dále týká DNA sekvencí kodujících farmaceutické peptidy nebo bílkoviny, do nichž se pro vyšší expresi nebo sekreci zavádí N-glykosylační konsensus místo do neesenciální oblasti, která je součástí prekursoru, ale ne maturního produktu.

199 2-96

č.j.	053975
DOŠLO	30. VII 95
URAD	PRŮMYSLového VLASTNICTVÍ
PŘÍL.	1

DNA sekvence kódující nové biosyntetické prekursory insulínu a postup přípravy insulínu

Oblast techniky

Tento vynález se týká DNA sekvencí kódujících nové biosyntetické prekursory insulínu a přípravy insulínu kultivací transformovaných buněk obsahujících takovéto DNA sekvence.

Dosavadní stav techniky

Insulin je hormon, jehož primární rolí je řízení transportu glukosy z krevního oběhu do buněk, kde je metabolizována.

Insulin sestává z dvou řetězců aminokyselin: řetězce A, obsahujícího 21 aminokyselin a řetězce B, obsahujícího 30 aminokyselin, přičemž tyto řetězce jsou vázány jeden k druhému dvěma disulfidovými můstky. Třetí disulfidový můstek se nalézá v řetězci A.

Primární forma insulinové molekuly je syntetizována jako nascentní polypeptidový řetězec nazývaný preproinsulin, jenž sestává ze signálního peptidu a proinsulínu. Signální peptid směřuje nascentní řetězec skrz endoplasmatické retikulum. Proinsulin se tvoří z preproinsulínu v oblasti lumenu endoplasmatického retikula, když polypeptidový řetězec prochází membránou. Proinsulin zahrnuje polypeptidový řetězec obsahující 35 aminokyselin, jenž není přítomný v insulinu. Tento spojovací peptid neboli C-peptid spojuje karboxy- konec řetězce B s aminokoncem řetězce A budoucí molekuly insulinu. Z lumenu endoplasmatického retikula je proinsulin směřován ke Golgiho aparátu, kde začíná proteolýsa spojovacího peptidu. Spojovací neboli C-peptid je odštěpen enzymovým systémem podobným systému trypsin / karboxypeptidasa B, jenž působí u sekvence dvou následujících basických aminokyselin, a tvoří se insulin (Steiner et al., J. Cell Biol. 24, (1984) 121-130).

Význam C-peptidu spočívá v tom, že spojuje řetězce A a B tak, aby se umožnila správná tvorba disulfidových můstků v molekule insulinu (Bell et al., Nature 284, (1980) 26-32) nebo v tom, že řídí trypsinu podobný konvertující enzym ke zpracování proinsulinu v místě se dvěma basickými aminokyselinami (Thim et al., PNAS, 83 (1986) 6766-6770).

Produkce biosyntetického lidského insulinu byla zveřejněna hlavně v bakteriích *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae*. Pro všechny je společné, že DNA sekvence kóduje buď celý proinsulin, modifikovanou část proinsulinu nebo zvláště řetězce A a B.

V bakterii *E. coli* byl insulin produkován buď prostřednictvím oddělených řetězců A a B (Chance et al., Diabetes Care 4 (1982) 147-154) nebo jako proinsulin, EP 55945.

V kvasinkách *S. cerevisiae* byl insulin produkován prostřednictvím proinsulinu, avšak s velmi nízkým výtěžkem, EP-A-121 884. Různé modifikace C-peptidu zlepšují výtěžek a správnou tvorbu insulinové molekuly v kvasinkách.

Insulinové prekursory vzorce B-X-A, kde B a A reprezentují řetězce B a A a kde X reprezentuje peptid obsahující od 2 do 35 aminokyselin, jsou popsány v DK-A-5284/87.

Insulinové prekursory vzorce B-X-Y-A, kde B a A reprezentují řetězce B a A a kde X a Y každý reprezentuje lysin nebo arginin jsou zveřejněny v EP-A-347 845.

V EP-A-163 529 jsou popsány insulinové prekursory obsahující peptidový řetězec B(1-29)-A(1-21) spojený s krátkým peptidem majícím 2 až 8 aminokyselin. Modifikace prekursorů des-B(30) insulinu se vzorcem B(1-29)-X₁-X₂-Y₂-Y₁-A(1-21) jsou popsány v EP-A-347 845.

V EP-A-249 350 jsou popsány glukoamylasový promotor a signální sekvence pro sekreci bílkovin v plísňích jako hostiteli. Jako příklad byl exprimovaný trimer proinsulinu též zařazen do takového vektoru exprese.

Mnohé polypeptidy pro léčebné nebo diagnostické účely, např. erythropoietin, tPA a faktor VIII, byly N-glykosylovány (Parekh et al., TIBTECH 7 (1989) 117-121). Zde byl též popsán trojnásobně zvýšený výtěžek bovinního chymosinu (glykochymosinu) v plísni *A. niger* var. *awamori* dosažený zavedením N-glykosylačního konsensus místa do kódující sekvence. Fuzí prochymosinového a glukoamylasového genu byl dosažen ještě vyšší výtěžek, ale fuzí glykochymosinu ke glukoamylase nebylo dosaženo žádného dalšího zvýšení výtěžku (Berka et al., Biochem. Soc. Trans. 19 (1991) 681-685).

V případě aspartátové proteinasy (reninu), jež je mikrobiálního původu a slouží jako náhražka chymosinu, bylo pozorováno, že hyperglykosylace může snižovat enzymovou aktivitu, když nastává v kritickém místě molekuly (Berka et al., Biochem. Soc. Trans. 19 (1991) 681-685; Aikawa et al., J. Biol. Chem. 265 (1991) 13955-13959).

Mutace glykosylovaného asparaginu v kódující oblasti reninu vedla k významnému snížení sekrece v buňkách kvasinek (Aikawa et al., J. Biol. Chem. 265 (1991) 13955-13959).

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou DNA sekvence kódující nové biosyntetické prekursory insulínu a použití eukaryotických buněk, zvláště buněk plísni, k preparaci insulínu.

Cíle se dosahuje sekvencí DNA zahrnující kódující sekvenci pro insulinový precursor vzorce B-Pg-A, kde B a A reprezentují řetězec B resp. řetězec A a kde Pg reprezentuje modifikovaný C-peptid nebo jakýkoli počet aminokyselin obsahující přinejmenším jedno konsensus místo N-glykosylace. Pg spojuje řetězce B a A signály proteolytického zpracování nebo místy specifického chemického štěpení.

Výhodné je modifikovat proinsulinový gen vytvořením glykosylačního místa AsnXSer. Toho lze dosáhnout v sekvenci

C-peptidu např. změnou kodonu GCC pro aminokyselinu Ala-C-20 na kodon AAC pro Asn.

Stejného principu lze použít u des-B(30)-proinsulinu.

Vynález je založen na zjištění, že výtěžek imunoreaktivního insulinu, měřený metodou RIA, je mnohem vyšší u transformantů obsahujících DNA sekvence vzorce B-Pg-A ve fuzi k chránící bílkovině než u transformantů obsahujících nemodifikované DNA sekvence proinsulinu ve fuzi k chránící bílkovině. Buňky transformované vektorem obsahujícím DNA sekvence proinsulinu bez fuze nebo proinsulinu modifikovaného N-glykosylačním konsensus místem bez fuze dávají velmi nízké nebo žádné výtěžky imunoreaktivního insulinu, měřené metodou RIA.

Zavedení N-glykosylačního konsensus místa do oblasti odstupu mezi řetězcí [*spacer*], jenž není součástí molekuly maturního insulinu, znamenitě zvyšuje expresi v buňkách plísni, jež jsou transformovány DNA sekvencemi kódujícími takoveto fúzované prekursory insulinu. Bílkovina fúzovaná s proinsulinem může být buď zpracována v hostitelském organismu samotném anebo odstraněna pozdějším enzymatickým nebo chemickým štěpením.

DNA sekvence kódující řečený modifikovaný prekursor insulinu může být připravena oligonukleotidovou syntézou celé DNA sekvence v kombinaci s PCR nebo *in vitro* mutagenesou. Kodony DNA sekvence mohou být též optimalizovány pro expresi ve vhodném organismu, s výhodou v kmeni plísně.

Vynález se též týká postupu přípravy insulinu kultivací vhodných buněk ve vhodném kultivačním médiu, s výhodou buněk plísni, transformovaných vektorem obsahujícím DNA sekvenci kódující insulinový prekursor vzorce B-Pg-A.

Exprese a sekrece peptidu shora uvedeného vzorce lze dosáhnout použitím vektoru, v němž je kódující sekvence regulována promotorem, signální sekvencí a terminátorem funkčním ve vhodném organismu. Mohou být jimi například *p_{glaA}* a signální sekvence *galA* genu nebo jejich části, vhodné pro expresi v *Aspergillus sp.* (Cullen et al., *Biotechnology*, 5 (1987) 369-376). Exprese a sekrece tohoto peptidu lze též dosáhnout

použitím vektoru exprese, v němž je DNA sekvence kódující insulinový prekursor shora uvedeného vzorce fúzovaná ke genu chránící bílkoviny prostřednictvím signálu pro zpracování (Ward et al., *Biotechnology*, 8 (1990) 435-440; Broekhuijsen et al., *J. Biotech.* 31 (1993) 135-145) nebo místa chemického stěpení.

Vynález se dále týká DNA sekvencí kódujících farmaceutické peptidy nebo bílkoviny, do nichž se pro vyšší expresi nebo sekreci proteinu zavádí N-glykosylační konsensus místo do neesenciálního místa jakékoli oblasti odstupu, jímž není kódována maturní bílkovina.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 ukazuje nukleotidovou sekvenci jak přirozeného tak kodonově optimalizovaného proinsulinového genu a odpovídající aminokyselinovou sekvenci, s použitím konvenčních zkratk pro nukleotidy a aminokyseliny.

Obr. 2 popisuje dva typy kazet pro expresi lidského proinsulinového genu a schematicky ukazuje lidský proinsulinový gen a mutantní gen, obsahující N-glykosylační konsensus místo.

Obr. 3 vysvětluje strategii konstrukce lidského proinsulinového genu a mutantního genu, obsahujícího N-glykosylační konsensus místo pro dva typy kazet exprese prostřednictvím fragmentů syntetizovaných separátně pomocí "překrývajících se oligonukleotidů v kombinaci s PCR".

Obr. 4 ukazuje 14 oligonukleotidů navržených pro syntézu lidského proinsulinového genu a mutantního genu, obsahujícího N-glykosylační konsensus místo.

Obr. 5 vysvětluje na příkladu syntézy fragmentu I nový přístup, jenž byl použit k syntéze lidského proinsulinového genu využitím překrývajících se, komplementárních oligonukleotidů v kombinaci s PCR.

Obr. 6 schematicky ukazuje syntézu fragmentu IV (oligonukleotidy jsou vyznačeny jen šipkami).

Obr. 7 schematicky ukazuje syntézu fragmentu II, fragmentu III a fragmentu V (oligonukleotidy jsou vyznačeny jen šipkami).

Obr. 8 ukazuje konstrukci plasmidů pPZG301, pPZG302, pPZG303, pPZG304, pPZG302.

Obr. 9 ukazuje konstrukci plasmidů pPZG311, pPZG302.

Obr. 10 ukazuje konstrukci vektoru exprese pro filamentární plísň a kazetu exprese typu I.

Obr. 11 ukazuje konstrukci vektoru exprese pro filamentární plísň a kazetu exprese typu II.

Obr. 12 ukazuje sekvenci u spojení *GlaG2* genu *glaA*.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza lidského proinsulinového genu a mutantního genu, obsahujícího N-glykosylační konsensus místo pomocí překrývajících se oligonukleotidů v kombinaci s polymerasovou řetězovou reakcí (PCR).

a) Metody

Všechny pokusy v manipulaci DNA byly provedeny s použitím standardních metod, jak jsou popsány v Maniatis T., et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. (1982).

Všechny chemikálie, enzymy a plasmidy jsou dostupné z různých komerčních zdrojů, pokud se neuvádí jinak. Pufry a reakční podmínky pro digesce restrikčními endonukleasami se použily podle doporučení výrobců, pokud není vyznačeno jinak.

Chemická syntéza oligonukleotidů byla provedena na zakázku u fy. ISOGEN Bioscience, Amsterdam, Nizozemí. Vzorky DNA byly dodávány v lyofilizované formě jako sodné sole s volnými hydroxylovými skupinami na 5' a 3' konci. Takováto DNA byla rozpouštěna ve sterilní MQ H_2O . Koncentrace jednovláknových DNA

oligonukleotidů byla stanovována měřením absorpance A_{260} . Vzorky rozpuštěných DNA oligonukleotidů byly skladovány při -20°C .

Polymerasová řetězová reakce, dále označována jako PCR, byla prováděna s přístrojem fy. Perkin Elmer Cetus (761 Main Ave., Norwalk CT 06859), soupravou GeneAmpTM DNA Amplification Reagent Kit a enzymem AmpliTaqTM Recombinant Taq DNA Polymerase. Koncentrované roztoky a reakční směsi byly připravovány podle "Perkin Elmer Cetus Protocol for DNA Amplification" jak je doporučováno výrobcem s tou výjimkou, že v reakční směsi nebyla žádná templátová DNA, ale jen oligonukleotidy v koncentraci 100 pmol na jednu reakci (100 μl). Profil teplotního cyklu pro každou PCR byl: Teplota tání 94°C / 1 min, teplota navázání oligonukleotidů [*annealing*] 40°C / 1 min (pro fragmenty I a IV) nebo 50°C / 1 min (pro fragmenty II, III a V), polymerizační teplota 72°C / 1 min. Cyklů bylo 25. Po posledním cyklu byla doba polymerizace prodloužena na 7 minut k dokončení polymerizace všech řetězců. Vzorek byl pak ochlazen na 4°C . Produkty PCR byly izolovány z reakční směsi dvěma kroky chloroformové extrakce. DNA pak byla sražena isopropanolem, vysušena ve vakuu a rozpuštěna v 50 μl TE pufru.

V pokusech s transformací a s amplifikací plasmidů byla použita bakterie *E. coli* K12 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985) 103-119).

Návrhy oligonukleotidů

Syntetický lidský proinsulinový gen byl odvozen z publikované sekvence lidského insulinového genu (Bell et al., Nature 284 (1980) 26-32). Mělo by být uvedeno, že když se gen syntetizuje, lze provádět určité modifikace: Je možné používat různé, ve většině případů preferované, kodony, zavádět dodatečné funkční DNA sekvence a restriční místa k umožnění ligace do vektoru exprese, měnit jeden nebo více kodonů kódující oblasti k produkci strukturně modifikovaného polypeptidu s v podstatě stejnou aktivitou nebo použitím.

V předkládaném vynálezu byl syntetický lidský proinsulinový

gen pro expresi v plísni modifikován. Byly použity kodony, jež jsou nejčastěji využívány v glukoamylasovém G 1 genu filamentární plísně *A. niger*, jenž je exprimován ve vysokém množství (Boel et al., EMBO J., 3 (1984) 1097-1102; Nunberg et al., Mol. Cell. Biol., 4 (1984) 2306-2315); ve většině případů jsou stejné jako lidské kodony s výjimkou určitých oblastí, kde by se výběrem preferovaných kodonů stal oligonukleotid velice bohatým na CG nukleotidy, což by mohlo způsobovat problémy v sekvenování a možná dokonce v PCR. Proto byly některé, většinou Gly kodony, změněny z GGC na GGT, což je druhý preferovaný Gly kodon v glukoamylasovém genu filamentární plísně *A. niger* (Obr. 1).

K 5' konci syntetického proinsulinového genu byly zavedeny dodatečné DNA sekvence kódující buď 18 aminokyselin signálního peptidu glukoamylasového (GlaA) genu anebo 6 aminokyselin propeptidu genu GlaA, obsahující Lys-Arg místo proteolytického štěpení, aby bylo možno zkonstruovat dva typy kazet exprese. V prvním případě (I) byl syntetický lidský proinsulinový gen regulován glukoamylasovým promotorem (p_{glaA}) a signální sekvencí (ss_{glaA}) glukoamylasového genu, zatímco ve druhém případě (II) byl pod řízením p_{glaA} proinsulinový gen fúzován s úplným genem *glaA* filamentární plísně *A. niger* prostřednictvím odstupového peptidu, obsahujícího signál zpracování proteinu podobný KEX-2 (Obr. 2).

Připraven byl též mutant syntetického lidského proinsulinového genu nesoucí konsensus místo N-glykosylace pro studium vlivu na úroveň exprese a sekrece. Jelikož C-peptid není esenciální pro funkci insulinu, protože je odštěpen v procesu sekrece, mutace byla zavedena do kódující oblasti C-peptidu lidského proinsulinového genu (BCA). Mutant (BPgA) nesoucí konsensus místo N-glykosylace AsnXSer byl připraven změnou kodonu GCC pro aminokyselinu Ala-C20 na kodon AAC pro aminokyselinu Asn (Obr. 2).

Pro syntézu lidského proinsulinového genu byl zaveden nový přístup, v němž se použily překrývající se, komplementární

oligonukleotidy v kombinaci s PCR. Principem metody bylo použít během PCR dva střední, překrývající se, komplementární oligonukleotidy současně jako templáty a primery a takto umožnit Taq DNA polymerase "zvětšit" je, t.j. prodloužit je během prvního cyklu. Ve druhém cyklu se takovéto "zvětšené" oligonukleotidy překrývají se sousedícími 3' nebo 5' oligonukleotidy a umožňují tím Taq DNA polymerase "dále zvětšovat" již "zvětšené" střední oligonukleotidy. Takto Taq DNA polymerasa ve skutečnosti vyplňuje mezery mezi chemicky syntetizovanými, překrývajícími se nukleotidy a vytváří dvoušroubovici DNA. Syntéza lidského proinsulinového genu a jeho mutantu obsahujícího konsensus místo N-glykosylace byla provedena ve fragmentech, jež byly separátně syntetizovány pomocí PCR. Štěpení genu na fragmenty bylo umožněno přítomností dvou štěpících míst pro restriční enzym PstI v kódující oblasti C-peptidu (Obr. 3). Bylo navrženo čtrnáct oligonukleotidů: Deset oligonukleotidů (B3, B4, B5, B6, C1, C2, C3, A1, A2, a A3) bylo odvozeno z DNA sekvence kódující lidský proinsulin s kodony preferovanými pro expresi ve filamentární plísni *A. niger*, dva oligonukleotidy (B1 a B2) byly navrženy pro zavedení signální sekvence *glaA* genu a dodatečných restričních míst k umožnění ligace do vektoru exprese typu I, jeden oligonukleotid (B7) byl navržen pro zavedení oblasti odstupu sekvence *glaA*(G2) genu a dodatečných restričních míst k umožnění ligace do vektoru exprese typu II, a jeden oligonukleotid (C4) byl navržen k zavedení mutace nesoucí konsensus místo N-glykosylace (Obr. 4).

b) PCR syntéza fragmentů I - V

Fragmenty I a IV

Fragmenty I a IV byly syntetizovány "krok za krokem". V prvním kroku PCR byla reakce provedena s oligonukleotidy B3 a B4, a vedla k produktu B3/B4. V následujícím "kroku" byl 1 μ l

produktu B3/B4 smíchán v reakční směsi PCR s: a) oligonukleotidy B2 a B5 pro fragment I, a b) oligonukleotidy B7 a B5 pro fragment IV. Byly získány produkty B2/B3/B4/B5 a B7/B3/B4/B5. Ve třetím "kroku" byl 1 μ l produktu B2/B3/B4/B5 použit pro PCR s oligonukleotidy B1 a B6 pro fragment I a 1 μ l produktu B7/B3/B4/B5 byl smíchán v reakční směsi PCR s oligonukleotidy B7 a B6 pro fragment IV. Byly získány produkty B1/B2/B3/B4/B5/B6 a B7/B3/B4/B5/B6. Jejich velikosti odpovídaly očekávaným, a produkty byly digerovány příslušnými restričními enzymy na fragment I a na fragment IV (Obr. 5 a 6).

Fragmenty II, III a V

Fragmenty II, III a V byly syntetizovány v jednom "kroku". PCR byla provedena s oligonukleotidy: a) C1, C2, C3; b) A1, A2, A3; a c) C2, C4, C5. PCR produkty C1/C2/C3, A1/A2/A3 a C2/C4/C5 měly očekávanou velikost a byly digerovány příslušnými restričními enzymy na fragment II, na fragment III a na fragment V (Obr. 7).

Klónování PCR-syntetizovaných fragmentů do vektoru pUC19 a analýza sekvence DNA

Plasmid pUC19 byl digerován: a) PstI, b) PstI/EcoRI, a c) PstI/SalI a ligován s patřičným fragmentem I-V za vzniku plasmidů pPZG301, pPZG302, pPZG303, pPZG304 a pPZG305 (Obr. 8). Těmito plasmidy byla transformována bakterie *E. coli* JM109. Ze získaných transformantů byla pDNA izolována "mini-preparací" a analyzována restričními enzymy. Transformanty *E. coli* obsahující správné plasmidy byly rozrůstány, jejich pDNA izolována pomocí kolony "QIAGEN typ 20" a sekvenována pomocí soupravy "SEQUENASE^R Version 2.0 kit". Vektory obsahující správně syntetizovanou a vloženou sekvenci byly použity pro další konstrukce.

pPZG311 a pPZG312

Vektory obsahující úplný lidský proinsulinový gen a mutantní gen s konsensus místem N-glykosylace se signální sekvencí *glaA* genu byly konstruovány jak následuje: pPZG311 byl konstruován ligací 173 bp EcoRI-PstI fragmentu izolovaného z pPZG301, 75 bp PstI-PstI fragmentu izolovaného z pPZG302 a 74 bp PstI-SalI fragmentu izolovaného z pPZG303 do EcoRI/SalI digerovaného pUC19 vektoru. pPZG312 byl konstruován ligací 173 bp EcoRI-PstI fragmentu izolovaného z pPZG301, 75 bp PstI-PstI fragmentu izolovaného z pPZG305 a 74 bp PstI-SalI fragmentu izolovaného z pPZG303 do EcoRI/SalI digerovaného pUC19 vektoru (Obr. 9).

Příklad 2

Konstrukce vektoru exprese pro filamentární plíseň

I. Kazeta exprese typu I

pAN52-7NotBCA a pAN52-7NotBPgA

pAN52-7*Nouida* (Verdoes et al., Gene (1994) v tisku) byl digеровán parciálně NcoI a SalI. 7,55 kb SalI-NcoI fragment nesoucí promotor *glaA* a terminační oblast *trpC* genu byl izolován a ligován s 317 bp NcoI-SalI fragmentem plasmidu pPZG311 za vzniku plasmidu pAN52-7NotBCA a s 317 bp NcoI-SalI fragmentem plasmidu pPZG312 za vzniku plasmidu pAN52-7NotBPgA (Obr. 10).

pAN52-7BCAamdS a pAN52-7BPgAamdS

5,0 kb NotI fragment nesoucí gen acetamidasy (*amdS*) z *A. nidulans* byl zaligován do NotI místa plasmidů pAN52-7NotBCA a pAN52-7NotBPgA za vzniku plasmidů pAN52-7BCAamdS a pAN52-7BPgAamdS (Obr. 10).

I. Kazeta exprese typu II

pAN56-7BCAamdS a pAN56-7BPgAamdS

Vektory pro fúzované bílkoviny glukoamylasa-proinsulin a glukoamylasa-proinsulinový mutant s konsensus místem N-glykosylace byly konstruovány jak následuje: Plasmid pPZG304 byl digerován EcoRV a AlwNI. Fragment EcoRV-AlwNI o 25 bp, nesoucí sekvenci šesti aminokyselin oblasti odstupu, byl ligován s 3,07 kb SalI-EcoRV fragmentem z pAN56-7 nesoucím *glaA*(G2) gen za vzniku fragmentu SalI-AlwNI. Vektor pAN56-7 byl získán z vektoru pAN56-4 (Broekhuijsen et al., J. Biotech. 31 (1993) 135-145), v němž byl *gpdA* promotor nahražen 4,2 kb NotI-NcoI fragmentem z pAN52-7, nesoucím *glaA* promotor, a v něj byl odstraněn interleukinový gen odstraněn, s ponecháním EcoRV místa "nahoru" od *GlaG2*. Fragment AlwNI-SalI byl pak ligován s 10,6 kb HindIII-SalI fragmentem z pAB1-6S (Den Herder et al., Mol. Gen. Genet. 233 (1992) 404-410), jenž měl promotor *glaA* a gen *amdS* a s a) 1,06 kb AlwNI-HindIII fragmentem z pAN52-7BCA za vzniku plasmidu pAN56-7BCAamdS a b) 1,06 kb AlwNI-HindIII fragmentem z pAN52-7BPgA za vzniku vektoru pAN56-7BPgAamdS (Obr. 11). V oblasti odstupu bylo dibazické místo zpracování Lys-Arg. Sekvence kolem míst fuze glukoamylasového genu s lidským proinsulinovým genem (BCA) a proinsulinovým mutantem (BPgA) pomocí oblasti odstupu je ukázána v Obr. 12.

Příklad 3

Transformace filamentární plísně *Aspergillus niger*

Transformace filamentární plísně *Aspergillus niger* byla provedena podle již popsáných metod (Goosen et al., Curr. Genet. 11 (1987) 499-503; Kelly a Hynes, EMBO J. 4 (1985) 475-479; Van Hartingsvelt et al., Mol. Gen. Genet. 206 (1987) 71-75).

Filamentární plíseň *A. niger* N402 (Bos, C. J. et al., Curr. Genet. 14 (1988) 437-443) byla transformována vektory exprese pAN52-7BCAamdS, pAN52-7BPgAamdS, pAN56-7BCAamdS a pAN56-7BPgAamdS. Kolonie byly selektovány na kultivačním médiu s acetamidem nebo akrylamidem jako jedinými zdroji uhlíku a dusíku. Provedla se další analýza transformantů vycházející z jednotlivých spor.

Příklad 4

Sekrece lidského insulinu do kultivačního média

1. Kultivace transformantů *A. niger* nesoucích lidský proinsulinový gen a mutantní gen s konsensus místem N-glykosylace

Kolem 10^8 spor selektovaných transformantů bylo naočkováno do 500 ml Erlenmeyerových baněk obsahujících 100 ml tekutého kultivačního média obsahujícího: 70 mM NaNO_3 , 7 mM KCl, 11 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 4 % dextran, stopové prvky (1 : 1000; 76 mM ZnSO_4 , 178 mM H_3BO_3 , 25 mM MnCl_2 , 18 mM FeSO_4 , 7,1 mM CoCl_2 , 6,4 mM CuSO_4 , 6,2 mM Na_2MoO_4 , 174 mM EDTA) a vitaminy (1 : 1000; 100 mg/l thiamin, 100 mg/l riboflavin, 100 mg/l nikotinamid, 50 mg/l pyridoxin, 10 mg/l kyselina panthotenová, 0,2 mg/ml biotin). Transformanty rostly při 32°C po 36 hodin. Vzorky byly analyzovány na přítomnost insulinu.

2. Exprese insulinu

Exprese imunoreaktivního lidského insulinu byla demonstrována soupravou "Pharmacia INSULIN RIA 100" fy. Kabi Pharmacia Diagnostics. Vzorky transformantů kultivovaných fermentací byly filtrovány, filtráty neutralizovány, ředěny pokud to bylo potřebné a pak podrobeny stanovení RIA (radioimunotestu) (Livessy et al., Clin. Biochem. 13 (1980)

151-155). Hladina exprese imunoreaktivního lidského insulinu (mU/l) v *A. niger* je ukázána v Tabulce 1.

Tabulka 1

Hladina exprese imunoreaktivního lidského insulinu v různých transformantech *A. niger*:

Transformant	Plasmid	Imunoreaktivní insulin (mU/l)
<i>A. niger</i> 7650 [NCAIM (P) F 00215]	PAN52-7BCAamdS	0
<i>A. niger</i> 7651 [NCAIM (P) F 00216]	PAN52-7BPgAamdS	2
<i>A. niger</i> 7649 [NCAIM (P) F 00214]	PAN56-7BCAamdS	56
<i>A. niger</i> 7638 [NCAIM (P) F 00213]	PAN56-7BPgAamdS	776

Transformanty *A. niger* 7650, *A. niger* 7651, *A. niger* 7649 a *A. niger* 7638 byly uloženy v "Národní sbírce zemědělských a průmyslových mikroorganismů, H-1502 Budapest, P.O.B. 53, Maďarsko" dne 8. července 1994 pod přístupovými čísly NCAIM (P) F 00215, NCAIM (P) F 00216, NCAIM (P) F 00214, a NCAIM (P) F 00213 a v souladu s Budapešťskou dohodou o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účele patentovacího postupu, Prohlášením v případě původního uložení, podle Pravidla 6.1.

Z Tabulky je zřejmé, že existuje značný rozdíl v expresi transformantů obsahujících různé vektory. Daleko nejlepší výsledky se ukazují u transformanta získaného transformací vektorem, jenž má lidský proinsulinový gen, nesoucí konsensus místo N-glykosylace, fúzovaný s glukoamylasovou bílkovinou.

PATENTSERVIS

Praha a.s.

- 5 -

Adler

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. DNA sekvence v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje sekvenci kódující insulinové prekursory vzorce B-Pg-A, kde B a A reprezentují řetězec B respektive A lidského insulinu a kde Pg reprezentuje modifikovaný C-peptid nebo libovolný počet aminokyselin, zahrnující přinejmenším jedno konsensus místo N-glykosylace, a Pg spojuje řetězce B a A prostřednictvím signálu proteolytického zpracování nebo místa chemického štěpení.
2. DNA sekvence v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje sekvenci kódující insulinové prekursory vzorce B(29)-Pg-A, kde B(29) reprezentuje B(1-29), A reprezentuje řetězec A lidského insulinu a kde Pg reprezentuje modifikovaný C-peptid nebo libovolný počet aminokyselin, zahrnující přinejmenším jedno konsensus místo N-glykosylace, a Pg spojuje řetězce B a A prostřednictvím signálu proteolytického zpracování nebo místa chemického štěpení.
3. DNA sekvence podle nároků 1 až 2 v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje kodony preferované pro expresi v určitém hostiteli.
4. DNA sekvence podle nároků 1 až 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e je fúzovaná s genem chránící bílkoviny prostřednictvím oblasti odstupu, nesoucí signál proteolytického zpracování nebo místo chemického štěpení.
5. DNA sekvence v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje sekvenci kódující farmaceutický peptid nebo protein, jenž má zavedeno konsensus místo N-glykosylace v neesenciálním místě kterékoli oblasti odstupu.

6. Transformované buňky v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahují DNA sekvenci podle nároků 1 až 5.
7. Transformované buňky plísně v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e obsahují DNA sekvenci podle nároků 1 až 5.
8. Transformované buňky plísně *Aspergillus* sp.
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahují DNA
sekvenci podle nároků 1 až 5.
9. Transformované buňky v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahují segment DNA podle nároků 1 až 5.
10. Transformované buňky plísně v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e obsahují segment DNA podle nároků 1 až 5.
11. Transformované buňky plísně *Aspergillus* sp.
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahují segment
DNA podle nároků 1 až 5.
12. Postup pro přípravu insulínu v y z n a č u j í c í s e
kultivací vhodných buněk, s výhodou buněk plísně,
transformovaných vektorem obsahujícím sekvenci DNA podle
nároků 1 až 4.
13. Postup pro přípravu farmaceutických peptidů nebo proteinů
v y z n a č u j í c í s e kultivací vhodných buněk,
s výhodou buněk plísně, transformovaných vektorem
obsahujícím sekvenci DNA podle nároku 5.

PATENTSERVIS

Praha a.s.

5.

Kadlec

Obr. 1

řetězec B

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
TTT	GTG	AAC	CAA	CAC	CTG	TGC	GGC	TCA	CAC	CTG	GTG	GAA	GCT	CTC	TAC
X			X					X				X			
TTC	GTG	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC	CAC	CTG	GTG	GAG	GCT	CTC	TAC

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Arg	Arg
CTA	GTG	TGC	GGG	GAA	CGA	GGC	TTC	TTC	TAC	ACA	CCC	AAG	ACC	CGC	CGG
X			X	X	X	X				X			X	X	X
CTG	GTG	TGC	GGT	GAG	CGC	GGT	TTC	TTC	TAC	ACC	CCC	AAG	ACT	CGT	CGC

řetězec C

Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Gly	Gln	Val	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro
GAG	GCA	GAG	GAC	CTG	CAG	GTG	GGG	CAG	GTG	GAG	CTG	GGC	GGG	GGC	CCT
	X						X					X	X	X	X
GAG	GCT	GAG	GAC	CTG	CAG	GTG	GGC	CAG	GTG	GAG	CTG	GGT	GGT	GGT	CCC

(Asn)

Gly	Ala	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Leu	Glu	Gly	Ser	Leu	Gln	Lys
GGT	GCA	GGC	AGC	CTG	CAG	CCC	TTG	GCC	CTG	GAG	GGG	TCC	CTG	CAG	AAG
	X			X			X				X				
GGT	GCC	GGC	AGC	CTC	CAG	CCC	CTG	GCC	CTG	GAG	GGC	TCC	CTG	CAG	AAG

(AAC)

řetězec A

Arg	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln
CGT	GGC	ATT	GTG	GAA	CAA	TGC	TGT	ACC	AGC	ATC	TGC	TCC	CTC	TAC	CAG
X		X		X	X		X	XX							
CGC	GGC	ATC	GTG	GAG	CAG	TGC	TGC	ACC	TCC	ATC	TGC	TCC	CTC	TAC	CAG

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn [Konec]
CTG GAG AAC TAC TGC AAC TAG

CTG GAG AAC TAC TGC AAC TAG

Horní nukleotidová sekvence ukazuje kódující sekvenci přirozeného lidského insulínu
Dolní nukleotidová sekvence ukazuje syntetickou kodonově optimalizovanou oblast
lidského insulínu

Tučná písmena označují řetězce A a B lidského insulínu

X ukazuje změny v kodonech v důsledku využití kodonů preferovaných v *Aspergillus*

() ukazuje zavedenou mutaci, přinášející konsensus místo N-glykosylace, AsnXSer

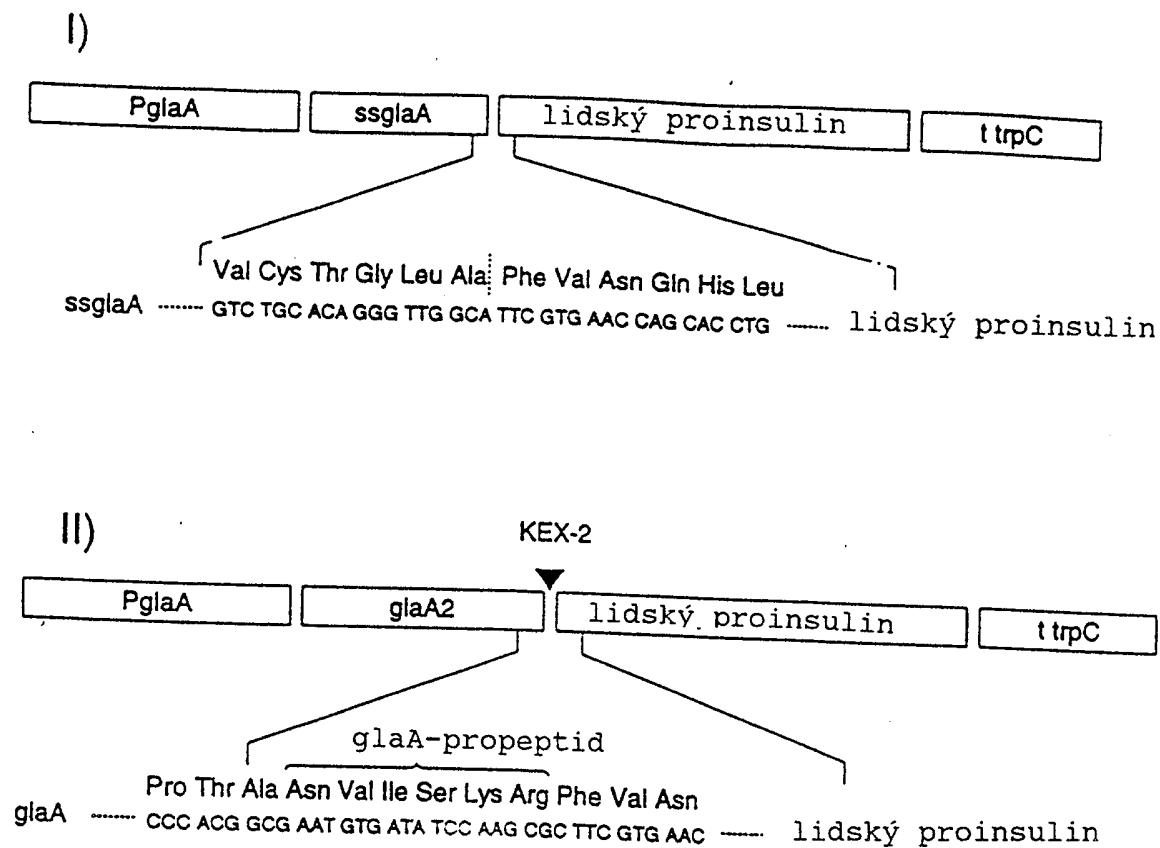
PATENTSERVIS

Praha a.s.

Kiddecon

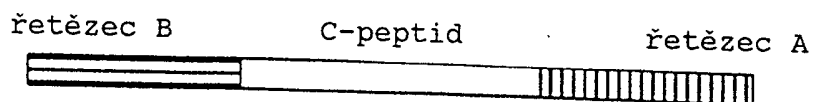
Obr. 2

Dva typy kazet exprese pro lidský proinsulin

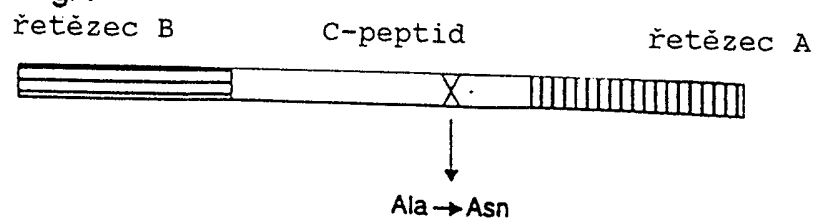


Schematická representace genu lidského proinsulinu a jeho mutantu nesoucího konsensus místo N-glykosylace

1) BCA

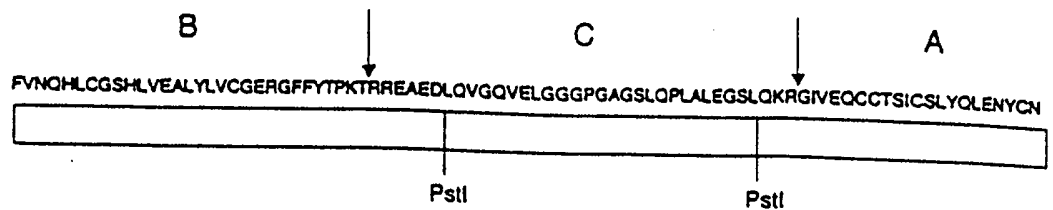


2) BPgA

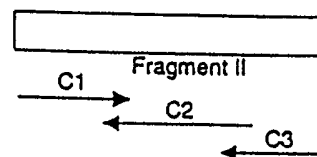
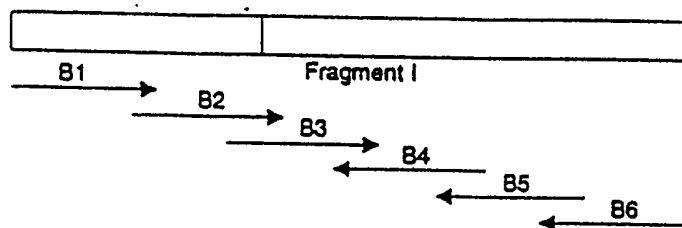


Obr. 3

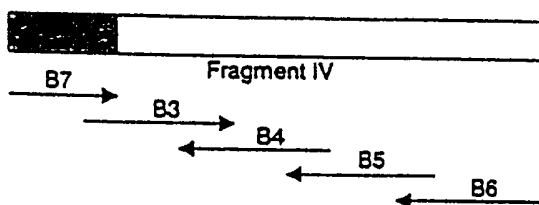
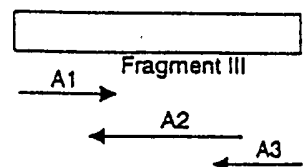
Strategie pro návrhy oligonukleotidů



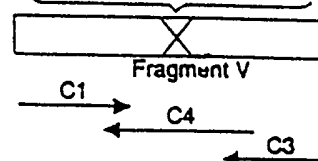
18 aminokyselin signální
sekvence *glaA* genu



6 aminokyselin
propetidu



aminokyselina C-20, Ala -> Asn



PATENTSERVIS

Praha a.s.

Pádelcon

Obr. 4

OligoB1: 43-mer ^{Met}
5'-CCGGAATTCC ATGGCGTTCC GATCTCTACT CGCCCTGAGC GGC-3'
EcoRI NcoI

OligoB2: 41-mer
5'-CCTGAGCGGC CTCGTCTGCA CAGGGTTGGC ATTCGTGAAC C-3'

OligoB3: 38-mer
5'-TTCGTGAACC AGCACCITGTG CGGCTCCAC CTGGTGG-3'
AlwNI

OligoB4: 36-mer
5'-GCTCACCGCA CACCAGGTAG AGAGCCTCCA CCAGGT-3'

OligoB5: 36-mer
5'-AGTCTTGGGG GTGTAGAAGA AACCGCGCTC ACCGCA-3'

OligoB6: 40-mer
5'-GGAATTCTGC AGGTCCTCAG CCTCGCGACG AGTCTTGGGG-3'
EcoRI PstI

OligoB7: 32-mer
5'-CCGGAATTCC ATATCCAAGC GCTTCGTGAA CC-3'
EcoRI EcoRV

OligoC1: 41-mer
5'-GGAATTCTGC AGGTGGGCCA GGTGGAGCTG GGTGGTGGTC C-3'
EcoRI PstI

OligoC2: 33-mer
5'-GGGGCTGGAG GCTGCCGGCA CCGGGACCAC CAC-3'
NaeI

OligoC3: 39-mer
5'-GGAATTCTGC AGGGAGCCCT CCAGGGCCAG GGGCTGGAG-3'
EcoRI PstI

OligoC4: 33-mer ^{Asn}
5'-GGGGCTGGAG GCTGCCGTTA CCGGGACCAC CAC-3'

OligoA1: 41-mer
5'-GGAATTCTGC AGAAGCGCGG CATCGTGGAG CAGTGCTGCA C-3'
EcoRI PstI

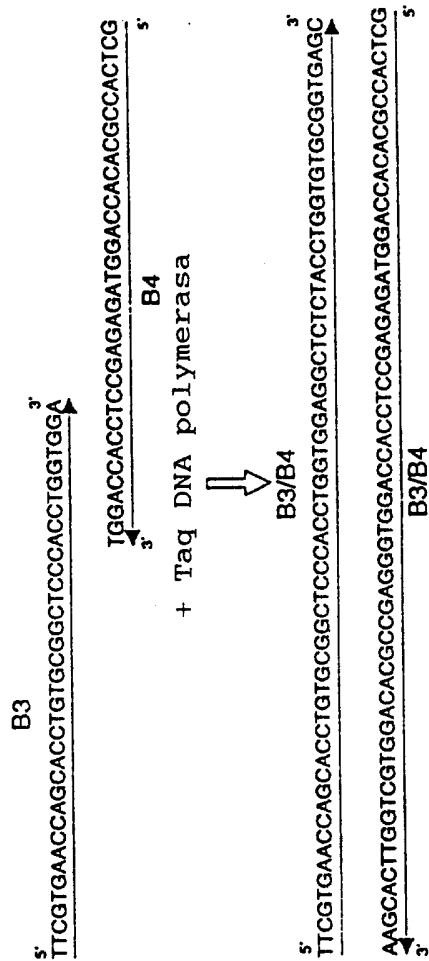
OligoA2: 40-mer
5'-TTCTCCAGCT GGTAGAGGGA GCAGATGGAG GTGCAGCACT-3'

OligoA3: 42-mer ^{Stop}
5'-GGAATTCCGGA TCCGTCGACC TAGTTGCAGT AGTTCTCCAG CT-3'
EcoRI BamHI Sall

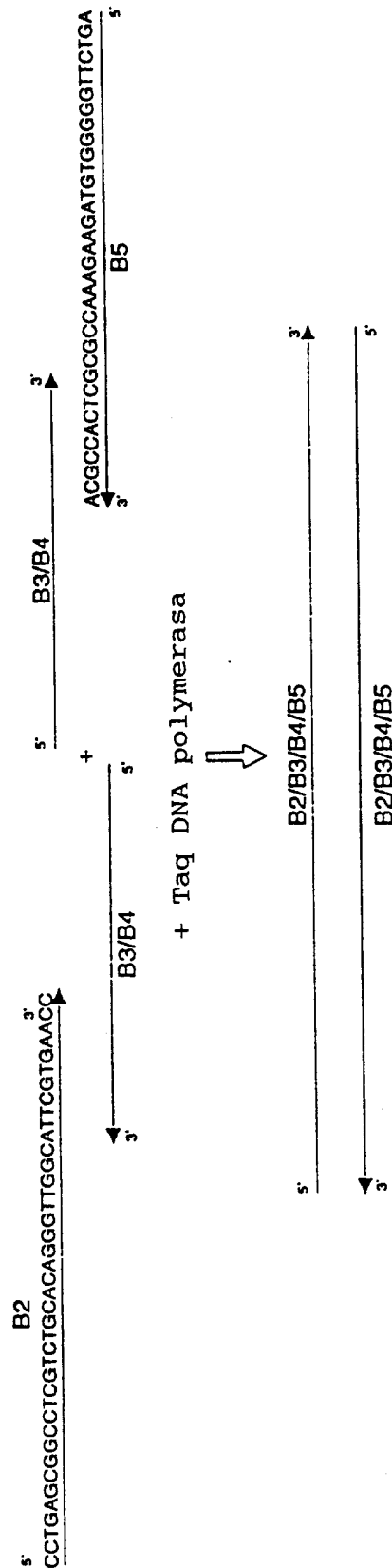
- - - - ukazuje štěpící místa restričních endonukleas
— označuje začátek (Met) a konec (Stop) translace
— označuje mutaci aminokyseliny Ala → Asn, která způsobí
odstranění NaeI místa v oligonukleotidu C4

Obz. 5

První PCR:

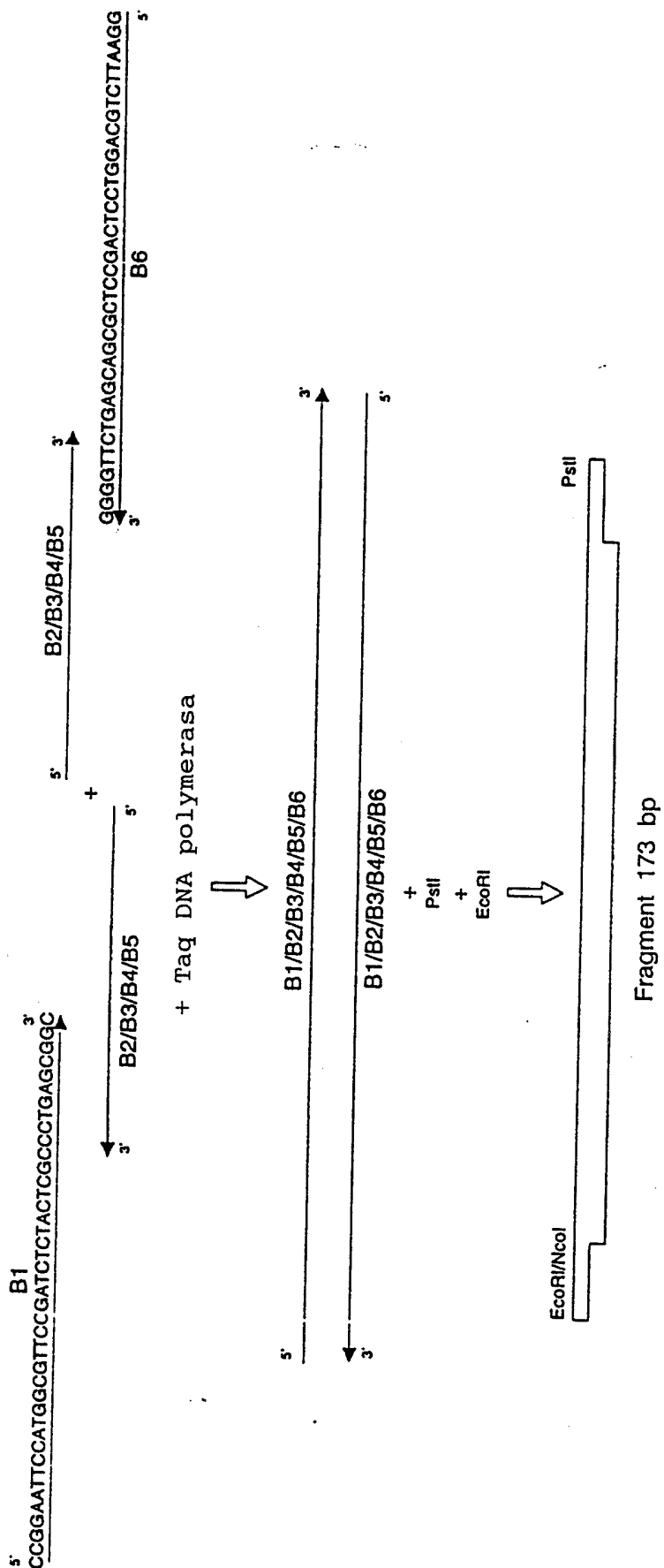


Následující PCR:



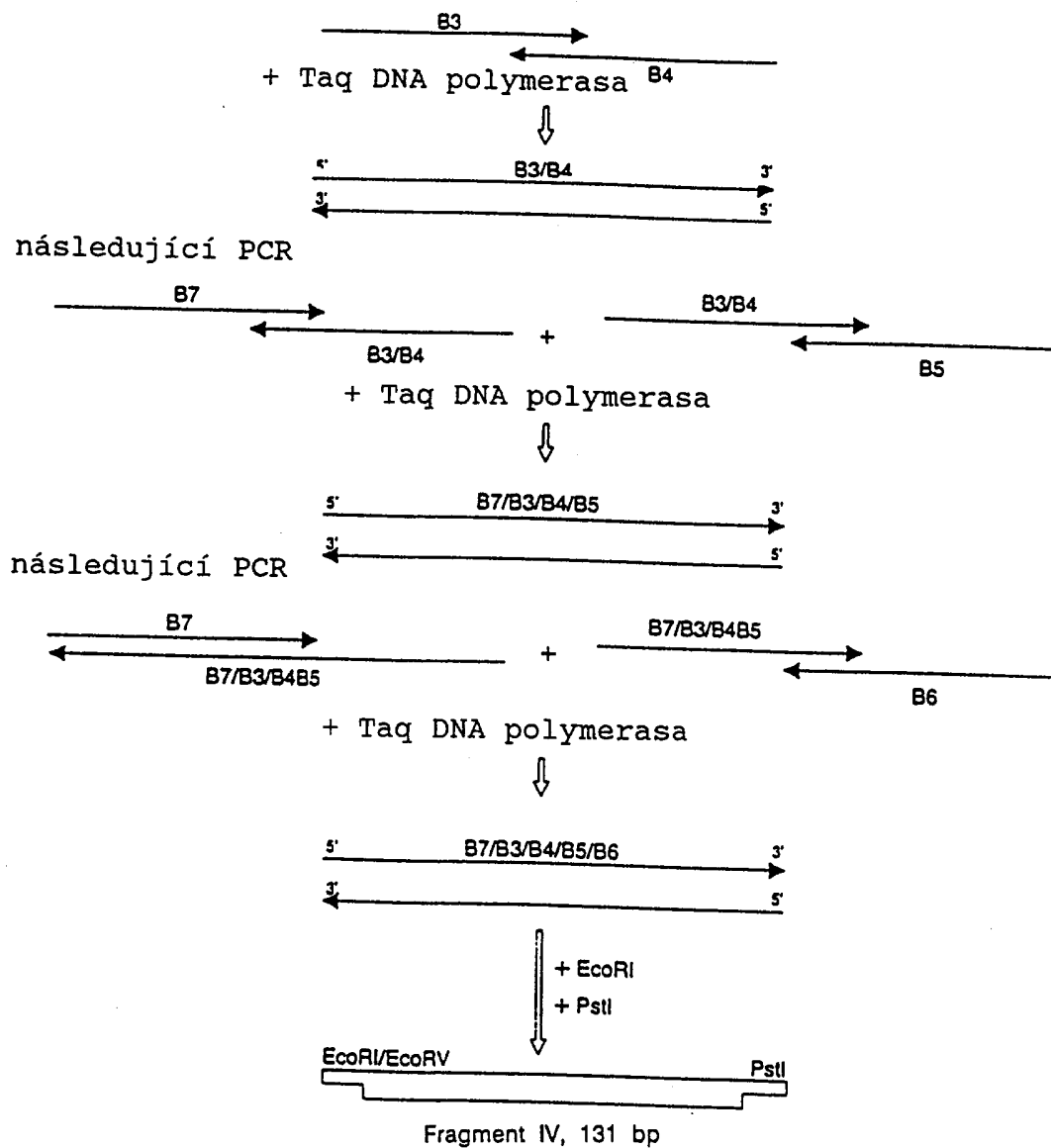
Obr. 5

Následující PCR:



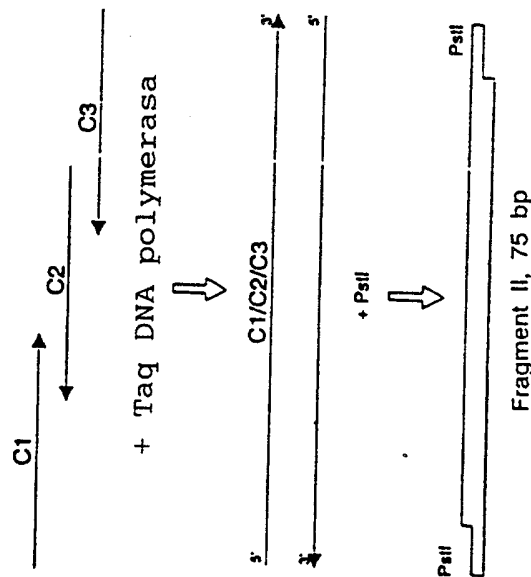
Obr. 6

PCR syntéza fragmentu IV

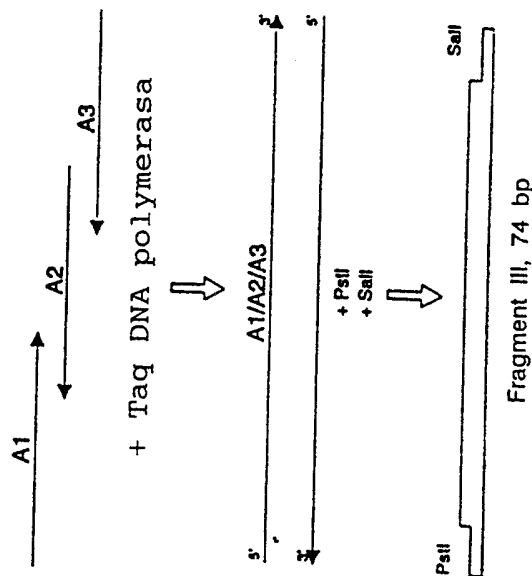


Obr. 7

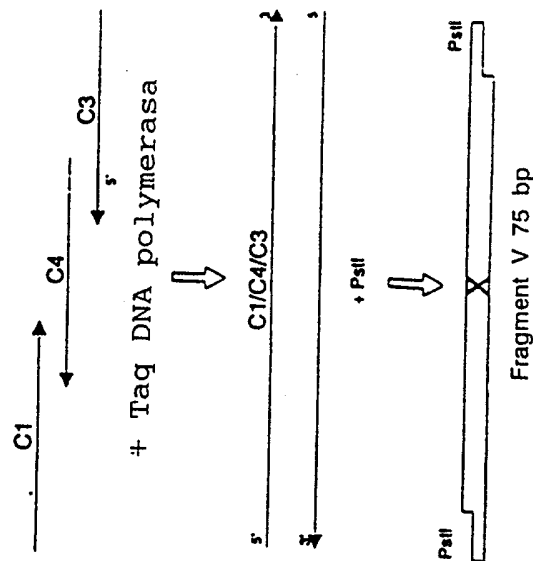
PCR syntéza fragmentu II



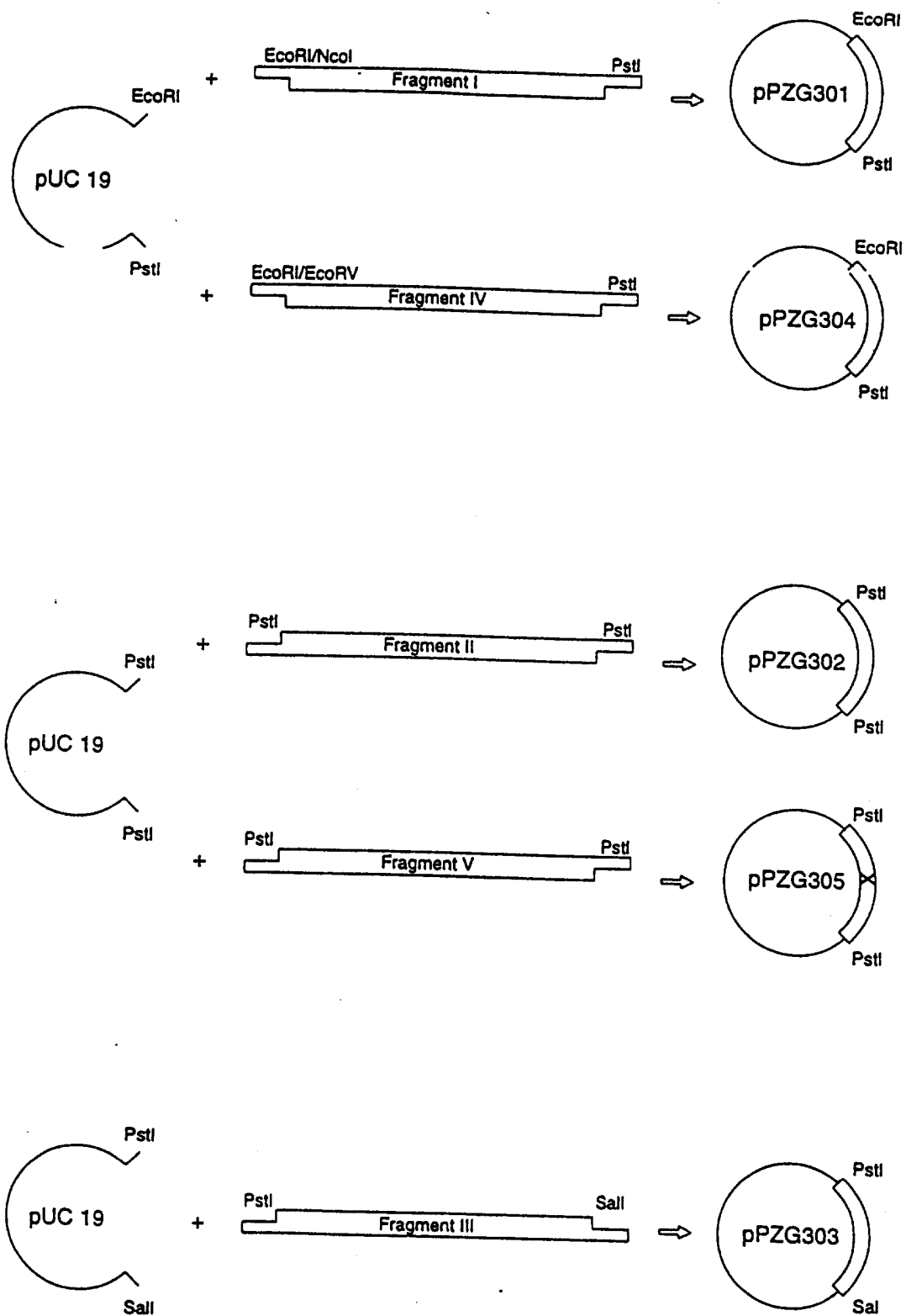
PCR syntéza fragmentu III



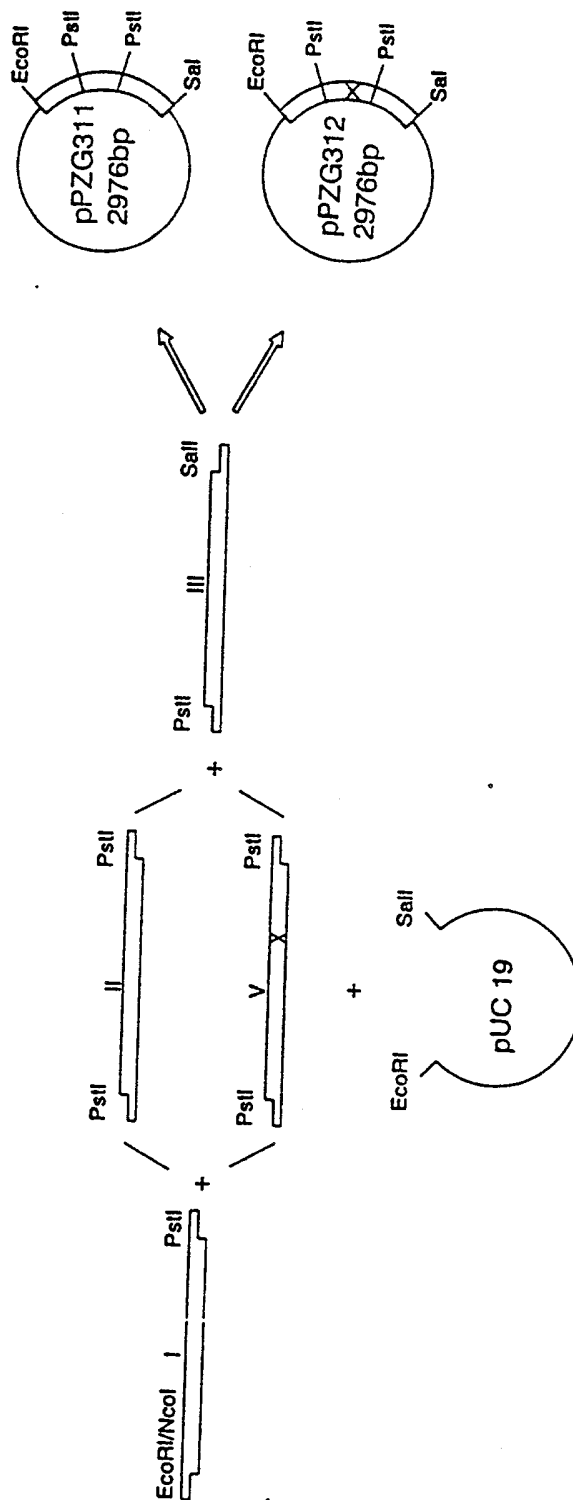
PCR syntéza fragmentu V



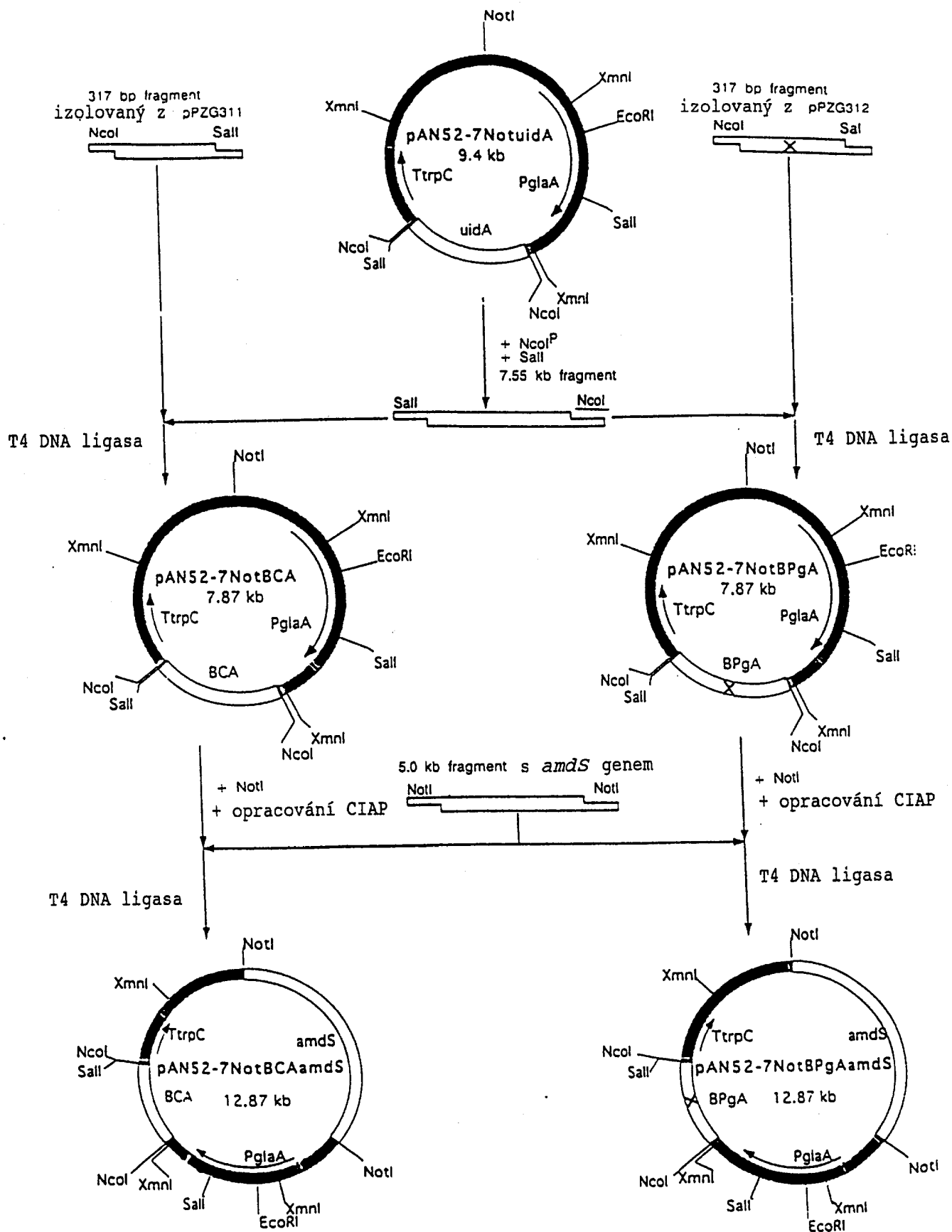
Obr. 8



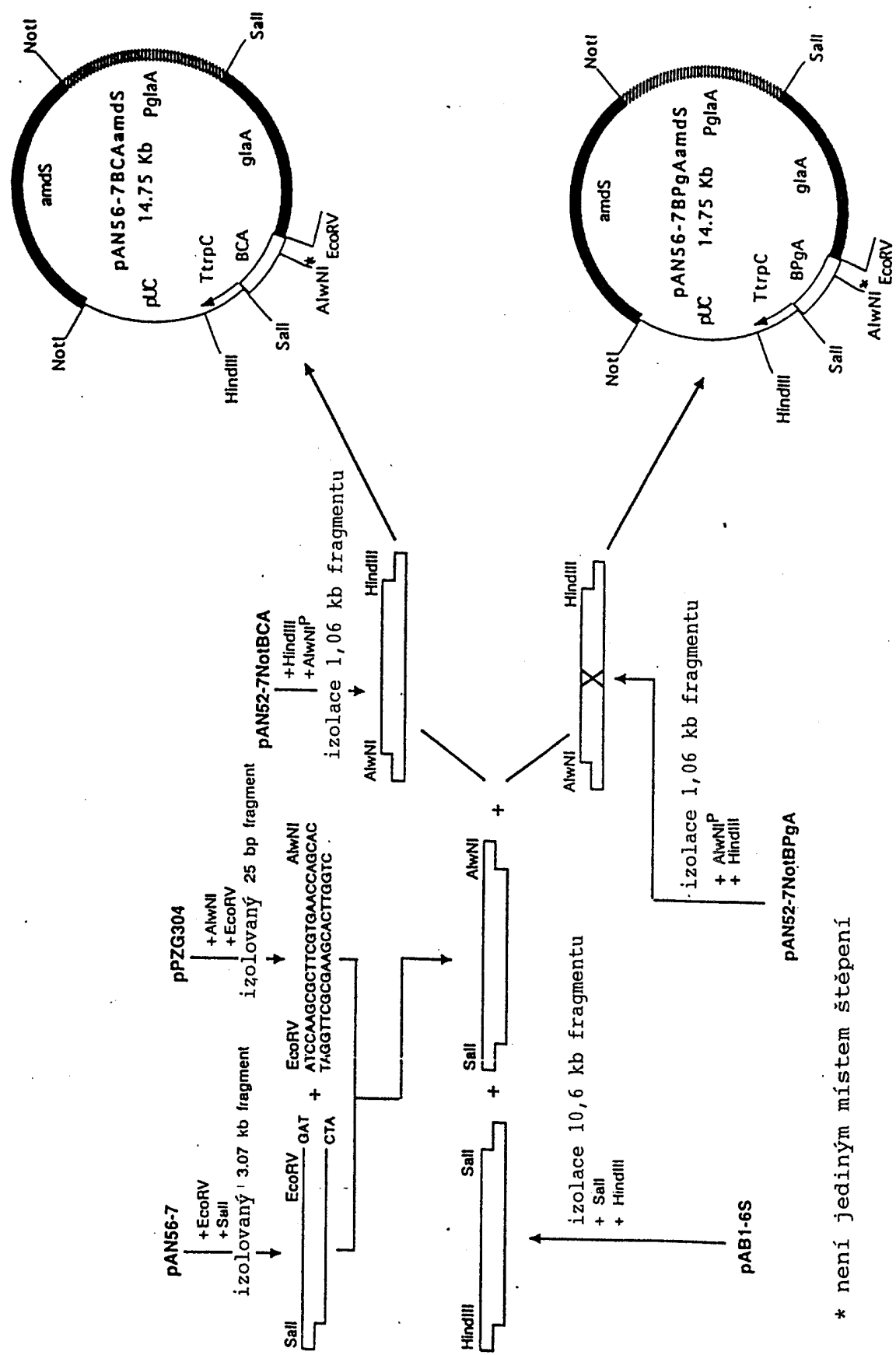
Obr. 9



Obr. 10



Obr. 11



* není jediným místem štěpení

Obr. 12

pAN56-7BCamds a pAN56-7BPgamds

CCC ACG GCG AAT GTG ATA TCC AAG CGC TTC GTG AAC

P T A N V I S K R F V N

512 513 514 19 20 21 22 23 24

K E X místo

GlaG2

oblast odstupu
(glaA propeptid)

lidský proinsulin
(a N-glykosyl. mutant)

PATENTSERVIS

Praha a.s.

Dr. J. Diller