



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2004 127 236** <sup>(13)</sup> **A**  
(51) МПК<sup>7</sup> **C 12 N 1/21, 15/00, 9/00, C**  
**12 P 21/00**

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: **2004127236/13, 13.02.2003**

(30) Приоритет: **13.02.2002 US PCT/US02/04294**

(43) Дата публикации заявки: **20.04.2005 Бюл. № 11**

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: **13.09.2004**

(86) Заявка PCT:  
**US 03/04288 (13.02.2003)**

(87) Публикация PCT:  
**WO 03/06892 (21.08.2003)**

Адрес для переписки:  
**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО**  
**"Юридическая фирма Городисский и Партнеры",**  
**пат.пов. Г.Б. Егоровой**

(71) Заявитель(и):  
**ДАУ ГЛОБАЛ ТЕКНОЛОДЖИЗ ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):  
**ЧЭВ Лоуренс С. (US),**  
**ТОЛБОТ Генри В. (US),**  
**ЛИ Стейси Л. (US)**

(74) Патентный поверенный:  
**Егорова Галина Борисовна**

(54) **ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭКСТРЕМОЗИМНЫХ ГЕНОВ У ПСЕВДОМОНАД И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ БАКТЕРИЙ**

Формула изобретения

1. Рекомбинантная клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный экстремозим, где рекомбинантная клетка относится к псевдомонадам.

2. Рекомбинантная клетка по п.1, где экстремозим является нативным по отношению к экстремофильному организму.

3. Рекомбинантная клетка по п.1, где рекомбинантная клетка экспрессирует экстремозимный белок.

4. Рекомбинантная клетка по п.1, где экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильного, психрофильного, ацидофильного, алкалофильного и галогенофильного экстремозима.

5. Рекомбинантная клетка по п.1, где экстремозим выбран из группы, состоящей из экстремофильных гидролаз, экстремофильной гликозилазы, амилаз, амилоглюкозидаз, глюкоамилаз, целлюлаз, целлобиогидролаз, эндоглюканаз, гемицеллюлаз, бета-глюкозидаз, амилаз, экстремофильных сериновых пептидаз, экстремофильных аспарагиновых эндопептидаз, пирролизинов и термопсинов.

6. Рекомбинантная клетка по п.1, где экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильных экстремозимов.

7. Рекомбинантная клетка по п.1, где экстремозим выбран из группы, состоящей из целлюлаз, амилаз, сериновых эндопептидаз и аспарагиновых эндопептидаз.

8. Рекомбинантная клетка по п.1, где экстремозим выбран из группы, состоящей из альфа-амилаз, пирролизина и термопсина.

9. Рекомбинантная клетка по п.1, где хозяйской клеткой является клетка *Pseudomonas fluorescens*.

10. Рекомбинантная клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный экстремозим, где рекомбинантная клетка выбрана из Грам(-)протеобактерий подгруппы 1, 2, 3, 5, 7, 12, 15, 17 или 18.

11. Рекомбинантная клетка по п.10, где экстремозим является нативным по отношению к экстремофильному организму.

12. Рекомбинантная клетка по п.10, где рекомбинантная клетка экспрессирует экстремозимный белок.

13. Рекомбинантная клетка по п.10, где экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильного, психрофильного, ацидофильного, алкалофильного и галогенофильного экстремозима.

14. Рекомбинантная клетка по п.10, где экстремозим выбран из группы, состоящей из экстремофильных гидролаз, экстремофильной гликозилазы, амилаз, амилоглюкозидаз, глюкоамилаз, целлюлаз, целлобиогидролаз, эндоглюканаз и гемицеллюлаз, бета-глюкозидаз, амилаз, экстремофильных сериновых пептидаз, экстремофильных аспарагиновых эндопептидаз, пирролизинов и термопсинов и гипертермофильных экстремозимов.

15. Рекомбинантная клетка по п.10, где экстремозим выбран из группы, состоящей из целлюлаз, амилаз, сериновых эндопептидаз и аспарагиновых эндопептидаз.

16. Рекомбинантная клетка по п.10, где экстремозим выбран из группы, состоящей из альфа-амилаз, пирролизина и термопсина.

17. Способ продуцирования рекомбинантной клетки, экспрессирующей экстремозим, включающий в себя

(а) получение хозяйской клетки, выбранной из псевдомонад;

(б) трансфицирование хозяйской клетки нуклеиновой кислотой, включающей в себя последовательность, кодирующую экзогенный экстремозим;

(с) выращивание трансфицированной хозяйской клетки в условиях, допускающих экспрессию экстремозима.

18. Способ по п.17, где экстремозим является нативным по отношению к экстремофильному организму.

19. Способ по п.17, при котором кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты оперативно связана с контрольной последовательностью.

20. Способ по п.17, при котором кодирующая последовательность и контрольная последовательность содержатся в экспрессирующем векторе.

21. Способ по п.17, при котором контрольная последовательность включает в себя промоторную последовательность.

22. Способ по п.17, при котором экстремозим связан с tag-последовательностью.

23. Способ по п.17, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильного, психрофильного, ацидофильного, алкалофильного и галогенофильного экстремозима.

24. Способ по п.17, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из экстремофильных гидролаз, экстремофильной гликозилазы, амилаз, амилоглюкозидаз, глюкоамилаз, целлюлаз, целлобиогидролаз, эндоглюканаз и гемицеллюлаз, бета-глюкозидаз, амилаз, экстремофильных сериновых пептидаз, экстремофильных аспарагиновых эндопептидаз, пирролизинов и термопсинов.

25. Способ по п.17, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильных экстремозимов.

26. Способ по п.17, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из целлюлаз, амилаз, сериновых эндопептидаз и аспарагиновых эндопептидаз.

27. Способ по п.17, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из альфа-амилаз, пирролизина и термопсина.

28. Способ по п.17, при котором последовательность экзогенной экстремозимной последовательности оптимизирована в соответствии с частотой использования кодона в

хозяйской клетке.

29. Способ по п.17, при котором последовательность экзогенного экстремозима изменена с целью улучшения каталитических свойств экстремозима.

30. Способ по п.17, при котором хозяйской клеткой является клетка *Pseudomonas fluorescens*.

31. Способ продуцирования рекомбинантной клетки, экспрессирующей экстремозим, включающий в себя

(а) получение хозяйской клетки, выбранной из Грам(-)протеобактерий подгруппы 1, 2, 3, 5, 7, 12, 15, 17 или 18;

(б) трансфицирование хозяйской клетки нуклеиновой кислотой, включающей в себя последовательность, кодирующую экзогенный экстремозим;

(с) выращивание трансфицированной хозяйской клетки в условиях, допускающих экспрессию экстремозима.

32. Способ по п.31, при котором экстремозим является нативным по отношению к экстремофильному организму.

33. Способ по п.31, при котором кодирующая последовательность нуклеиновая кислоты оперативно связана с контрольной последовательностью.

34. Способ по п.31, при котором кодирующая последовательность и контрольная последовательность содержатся в экспрессирующем векторе.

35. Способ по п.31, при котором контрольная последовательность включает в себя промоторную последовательность.

36. Способ по п.31, при котором экстремозим связан с tag-последовательностью.

37. Способ по п.31, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильного, психрофильного, ацидофильного, алкалофильного и галогенофильного экстремозима.

38. Способ по п.31, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из экстремофильных гидролаз, экстремофильной гликозилазы, амилаз, амилоглюкозидаз, глюкоамилаз, целлюлаз, целлобиогидролаз, эндоглюканаз и гемицеллюлаз, бета-глюкозидаз, амилаз, экстремофильных сериновых пептидаз, экстремофильных аспарагиновых эндопептидаз, пирролизинов, термопсинов и гипертермофильных экстремозимов.

39. Способ по п.31, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из целлюлаз, амилаз, сериновых эндопептидаз и аспарагиновых эндопептидаз.

40. Способ по п.31, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из альфа-амилаз, пирролизина и термопсина.

41. Способ по п.31, при котором последовательность экзогенной экстремозимной последовательности оптимизирована в соответствии с частотой использования кодона в хозяйской клетке.

42. Способ по п.31, при котором последовательность экзогенного экстремозима изменена с целью улучшения каталитических свойств экстремозима.

43. Способ продуцирования экстремозима, включающий в себя получение рекомбинантной клетки, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный экстремозим, где рекомбинантная клетка относится к псевдомонадам, и выращивание рекомбинантной клетки в условиях, допускающих экспрессию экстремозима.

44. Способ по п.43, при котором экстремозим является нативным по отношению к экстремофильному организму.

45. Способ по п.43, при котором экстремозим экспрессируется с продуктивностью, составляющей по меньшей мере 1 г/л.

46. Способ по п.45, при котором продуктивность составляет по меньшей мере 4 г/л.

47. Способ по п.45, при котором продуктивность составляет по меньшей мере 6 г/л.

48. Способ по п.45, при котором продуктивность составляет по меньшей мере 10 г/л.

49. Способ по п.43, при котором рекомбинантная клетка экспрессирует экстремозим на уровне экспрессии, составляющем по меньшей мере 5% от общего клеточного белка.

50. Способ по п.43, при котором клетку выращивают до плотности клеток по меньшей мере 40 г/л.

51. Способ по п.43, при котором клетку выращивают при температуре в области приблизительно от 4°C приблизительно до 55°C.

52. Способ по п.43, при котором клетку выращивают в ферментационном объеме по меньшей мере 10 л.

53. Способ по п.43, при котором клетку выращивают в минерально-солевой среде.

54. Способ по п.43, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильного, психрофильного, ацидофильного, алкалофильного и галогенофильного экстремозима.

55. Способ по п.43, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из экстремофильных гидролаз, экстремофильной гликозилазы, амилаз, амилоглюкозидаз, глюкоамилаз, целлюлаз, целлобиогидролаз, эндоглюканаз и гемицеллюлаз, бета-глюкозидаз, амилаз, экстремофильных сериновых пептидаз, экстремофильных аспарагиновых эндопептидаз, пирролизинов, термопсинов и гипертермофильных экстремозимов.

56. Способ по п.43, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из целлюлаз, амилаз, сериновых эндопептидаз и аспарагиновых эндопептидаз.

57. Способ по п.43, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из альфа-амилаз, пирролизина и термопсина.

58. Способ по п.43, дополнительно включающий в себя индукцию экспрессии экстремозима индуктором.

59. Способ по п.43, при котором которой хозяйской клеткой является клетка *Pseudomonas fluorescens*.

60. Способ по п.43, при котором экстремозим соединен с tag-последовательностью.

61. Способ по п.43, при котором tag-последовательность облегчает очистку пептида.

62. Способ по п.43, при котором экстремозим секретируется.

63. Способ по п.43, при котором экстремозим является выделенным.

64. Способ по п.43, при котором экстремозим является очищенным.

65. Способ по п.43, при котором экстремозим экспрессируется в тельцах включения.

66. Способ по п.43, при котором экстремозим подвергают стадии рефолдинга.

67. Способ продуцирования экстремозима, включающий в себя получение рекомбинантной клетки, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую экзогенный экстремозим, где рекомбинантная клетка выбрана из Грам(-)протеобактерий подгруппы 1, 2, 3, 5, 7, 12, 15, 17 или 18, и выращивание рекомбинантной клетки в условиях, допускающих экспрессию экстремозима.

68. Способ по п.67, при котором экстремозим является нативным по отношению к экстремофильному организму.

69. Способ по п.67, при котором экстремозим экспрессируется с продуктивностью, составляющей по меньшей мере 1 г/л.

70. Способ по п.69, при котором продуктивность составляет по меньшей мере 4 г/л.

71. Способ по п.69, при котором продуктивность составляет по меньшей мере 6 г/л.

72. Способ по п.69, при котором продуктивность составляет по меньшей мере 10 г/л.

73. Способ по п.67, при котором рекомбинантная клетка экспрессирует экстремозим на уровне экспрессии, составляющей по меньшей мере 5% от общего клеточного белка.

74. Способ по п.67, при котором клетку выращивают до плотности клеток, по меньшей мере составляющей 40 г/л.

75. Способ по п.67, при котором клетку выращивают при температуре в интервале примерно от 4 до 55°C.

76. Способ по п.67, при котором клетку выращивают в ферментационном объеме, по меньшей мере составляющем 10 л.

77. Способ по п.67, при котором клетку выращивают в минерально-солевой среде.

78. Способ по п.67, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из гипертермофильного, психрофильного, ацидофильного, алкалофильного и

галогенофильного экстремозима.

79. Способ по п.67, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из экстремофильных гидролаз, экстремофильной гликозилазы, амилаз, амилоглюкозидаз, глюкоамилаз, целлюлаз, целлобиогидролаз, эндоглюканаз и гемицеллюлаз, бета-глюкозидаз, амилаз, экстремофильных сериновых пептидаз, экстремофильных аспарагиновых эндопептидаз, пирролизинов, термопсинов и гипертермофильных экстремозимов.

80. Способ по п.67, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из целлюлаз, амилаз, сериновых эндопептидаз и аспарагиновых эндопептидаз.

81. Способ по п.67, при котором экстремозим выбран из группы, состоящей из альфа-амилаз, пирролизина и термопсина.

82. Набор для экспрессии экстремозима, включающий в себя

(а) некоторое количество хозяйских клеток, выбранных из псевдомонад;

(б) экспрессирующий вектор;

(с) инструкции по встраиванию нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую экзогенный экстремозим, в указанный экспрессирующий вектор;

(d) инструкции по трансформированию экспрессирующего вектора в хозяйскую клетку для получения рекомбинантной клетки.

83. Набор по п.82, дополнительно включающий в себя инструкции по выращиванию рекомбинантной клетки в условиях, допускающих экспрессию экстремозима.

84. Набор по п.82, дополнительно включающий в себя некоторое количество среды для роста клеток.

85. Набор по п.82, дополнительно включающий в себя некоторое количество индуктора для регуляции промотора в экспрессирующем векторе.

86. Набор по п.82, в котором хозяйской клеткой является клетка *Pseudomonas fluorescens*.

87. Набор для экспрессии экстремозима, включающий в себя

(а) некоторое количество хозяйских клеток, выбранных из Грам(-)протеобактерий подгруппы 1, 2, 3, 5, 7, 12, 15, 17 или 18;

(б) экспрессирующий вектор;

(с) инструкции по встраиванию нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую экзогенный экстремозим, в указанный экспрессирующий вектор;

(d) инструкции по трансформированию экспрессирующего вектора в хозяйскую клетку для получения рекомбинантной клетки.

88. Набор по п.87, дополнительно включающий в себя инструкции по выращиванию рекомбинантной клетки в условиях, допускающих экспрессию экстремозима.

89. Набор по п.87, дополнительно включающий в себя некоторое количество среды для роста клеток.

90. Набор по п.87, дополнительно включающий в себя некоторое количество индуктора для регуляции промотора в экспрессирующем векторе.

91. Набор по п.87, в котором хозяйской клеткой является клетка *Pseudomonas fluorescens*.