



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105459** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 9/64 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 07761**
(22) Дата подання заявки: **18.11.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **12.05.2014**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/416,622**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.11.2010**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.09.2013, Бюл.№ 17**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.05.2014, Бюл.№ 9**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2011/061334, 18.11.2011**
(72) Винахідник(и):
**Фозерінгхем Ян (GB),
Шеффілд Пітер Дж. (US)**
(73) Власник(и):
**АЛЛЕРГАН, ІНК.,
2525 Dupont Drive, Irvine, California 92612,
United States of America (US)**
(74) Представник:
Тузюк Галина Олександрівна, реєстр. №394
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
**US 6746859 B1, 08.06.2004
WO 2008136014 A1, 13.11.2008
CN 102061302 A, 18.05.2011
LISHENG PENG ET AL: "High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by Pichia pastoris", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 108, no. 2, 1 March 2004, pages 185-192**

(56) FANG Z J ET AL: "The Expression of Bovine Enterokinase Catalytic Subunit in Methylotropic Yeast Pichia pastoris", BIOINFORMATICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, 2009. ICBBE 2009. 3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON, IEEE, PISCATAWAY, NJ, USA, 11 June 2009, pages 1-3
DALY R ET AL: "EXPRESSION OF HETEROLOGOUS PROTEINS IN PICHIA PASTORIS: A USEFUL EXPERIMENTAL TOOL IN PROTEIN ENGINEERING AND PRODUCTION", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, HEYDEN & SON LTD., LONDON, GB, vol. 18, no. 2, 1 March 2005, pages 119-138
WU G ET AL: "The Synthetic Gene Designer: A flexible web platform to explore sequence manipulation for heterologous expression", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 47, no. 2, 1 June 2006, pages 441-445
GUSTAFSSON C ET AL: "Codon bias and heterologous protein expression", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 7, 1 July 2004, pages 346-353
SEONG II CHOI ET AL: "Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: Expression from Saccharomyces cerevisiae and its utilities in fusion protein technology", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 75, no. 6, 20 December 2001, pages 719-724
KITAMOTO Y ET AL: "Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of distinctive assortment of domains", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 91, 1 August 1994, pages 7588-7592

(54) КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЕНТЕРОКИНАЗИ В ДРІЖДЖАХ

(57) Реферат:

Винахід належить до ізольованої полінуклеотидної молекули, що кодує ентерокиназу, дріжджового експресійного конструкта, що включає дріжджовий вектор експресії і

UA 105459 C2

полінуклеотидні молекули, що кодують ентерокиназу, дріжджової клітини, що містить такий експресійний конструкт, способу продукування ентерокинази з використанням таких дріжджових клітин, і способу розщеплення або одержання рекомбінантного поліпептиду з використанням ентерокинази, що продукується за допомогою таких способів.

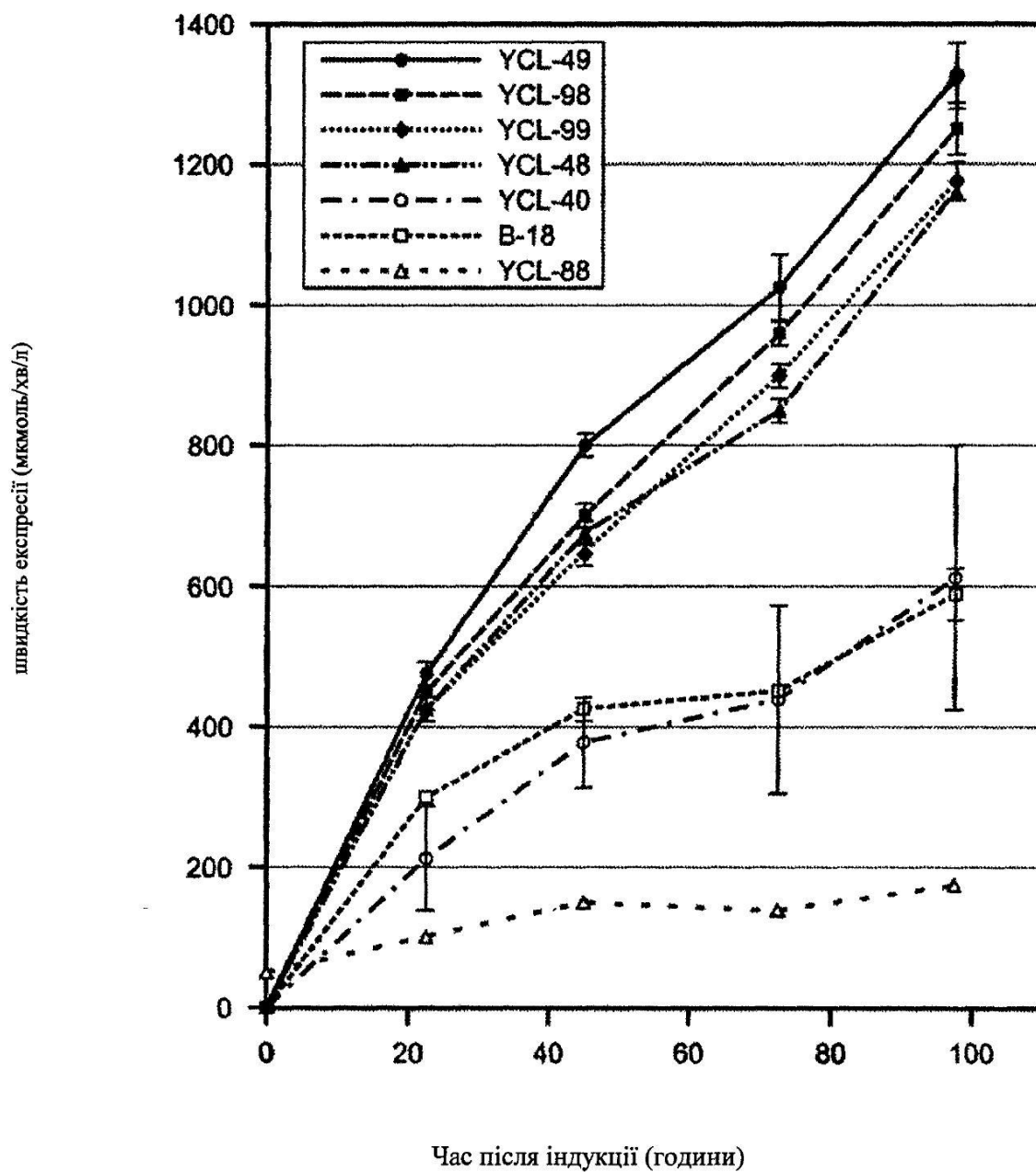


Fig. 1

Дана заявка претендує на пріоритет відповідно до 35 U.S.C. § 119(e) попередньої заявки на патент США № 61/416622, поданої 23 листопада 2010 р., яка включена в повному обсязі шляхом посилання.

Ентерокиназа (ЕК, також відома як ентеропептидаза (ЕП); ЕС 3.4.21.9) - це гетеродимерний глікопротеїн, що продукується клітинами дванадцятипалої кишки. Будучи членом хімотрипсिनного сімейства серинових протеаз, вона секретується кишковими залозами (ліберкюновими криптами) услід за надходженням проковтуваної їжі, що проходить із шлунку, і є присутньою в слизовій оболонці дванадцятипалої і тощої кишок. Залучена в переварювання дієтичних протеїнів, ЕК каталізує розщеплення N-кінцевого кислого пептидного фрагмента трипсиногена, перетворюючи цей зимоген на його активну форму трипсину. Активація трипсину ініціює каскад протеолітичних реакцій, що призводять до активації багатьох панкреатичних зимогенів, включаючи хімотрипсиногени, проеластази, прокарибоксипептидази і деякі проліпази.

Ентерокиназа може бути клонована з декількох джерел ссавців, включаючи, наприклад, людину, велику рогату худобу, щурів і мишей. Структурно ЕК є сериновою протеазою, що містить, приблизно, 82-140 кДа важкого ланцюга, який прикріплює ентерокиназу до пограничної мембрани кишкової щітки, і, приблизно, 35-62 кДа легкого ланцюга, який містить каталітичну субодиницю. Легкий ланцюг прикріплений до важкого ланцюга через одиничний дисульфідний місток. На додаток до цього одиничного міжмономерного дисульфідного містка легкий ланцюг містить додаткові вісім цистеїнових залишків для утворення специфічних внутрішньомономерних дисульфідних зв'язків. Ентерокиназний легкий ланцюг має каталітичну активність і є достатнім для розщеплення. ЕК, та її каталітично активні фрагменти є високоспецифічними до пентапептидної послідовності Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID № 1), розщеплюючи нестійкий хімічний зв'язок, що знаходиться за лізиновим залишком (DDDDK↓).

Через високу міру специфічності ЕК застосовують як прийнятний реагент у біохімічних і біотехнологічних прикладних технологіях. Наприклад, злитий протеїн, що містить С-кінцевий очисний тег (такий як полі-His), приєднаний за допомогою цієї послідовності до сайту розщеплення, може бути розщеплений за допомогою ЕК для видалення очисного тега з метою отримання кінцевого протеїну після очищення протеїну. Альтернативно, N-кінцева про-послідовність протеаз, яка має бути розщеплена перед активацією, може бути мутована для дозволу активації ентерокиназою.

Рекомбінантна ентерокиназа (rЕК) успішно продукується бактеріями, подібними до *Escherichia coli*, і дріжджами, подібними до *Pichia pastoris*, використовуючи ген, що продукує 28 кДа протеїн, який охоплює лише каталітичний домен легкого ланцюга. Проте, залишаються утруднення з точки зору експресії цього рекомбінантного ензима в дріжджах у достатніх кількостях для комерційного використання. Даний опис розкриває покращену експресійну конструкцію, корисну для рентабельного продукування рекомбінантної ентерокинази в кількостях, корисних для комерційного використання.

Короткий опис суті винаходу

Варіанти даного опису розкривають полінуклеотидні молекули, що кодують ентерокиназу. Розкриті полінуклеотидні молекули, що кодують ентерокиназу, включають SEQ ID № 4, SEQ ID № 6, їх нуклеотидні варіанти, їх усичені варіанти та/або їх комплімент, не обмежуючись названими. Полінуклеотид, розкритий у даному описі, може додатково містити дріжджовий вектор експресії. Інші варіанти винаходу розкривають дріжджовий експресійний конструкт, що містить дріжджовий вектор експресії і полінуклеотидну молекулу, що кодує ентерокиназу.

Інші аспекти даного винаходу розкривають дріжджові клітини, що містять дріжджовий експресійний конструкт, який включає молекулу полінуклеотиду, що кодує ентерокиназу. Розкритий дріжджовий експресійний конструкт може тимчасово міститись у дріжджовій клітині або міститись у дріжджовій клітині стабільно. Дріжджові клітини включають клітини штаму *Pichia pastoris*, клітини штаму *Pichia methanolica*, клітини штаму *Pichia angusta*, клітини штаму *Schizosaccharomyces pombe*, клітини штаму *Saccharomyces cerevisiae* або клітини штаму *Yarrowia lipolytica*, не обмежуючись перерахованими.

Інші варіанти даного винаходу розкривають способи продукування ентерокинази, використовуючи дріжджовий експресійний конструкт. Розкриті способи включають етап експресії в дріжджовій клітині дріжджового експресійного конструкта, розкритого в даному описі. Інший варіант винаходу охоплює способи продукування ентерокинази, що включають етапи введення дріжджового експресійного конструкта, розкритого в даному описі, в дріжджову клітину і експресування експресійного конструкта в дріжджовій клітині.

Інші варіанти даного винаходу розкривають способи розщеплення поліпептиду, що містить ентерокиназний сайт розщеплення, з використанням ентерокинази. Розкриті способи включають етап контактування поліпептиду, що включає ентерокиназний сайт розщеплення, з

ентерокіназою, де контактування поліпептиду з ентенокіназою призводить до специфічного розщеплення ентенокіназного сайту розщеплення. Використана ентенокіназа може бути ентенокіназою, що кодується молекулою полінуклеотиду, розкритою в даному описі, продукуюною з використанням дріжджового експресійного конструкта, розкритого в даному описі, та/або продукуюною за допомогою експресії в дріжджовій клітині, розкритій в даному описі.

Інші варіанти даного винаходу розкривають способи отримання поліпептиду, що містить ентенокіназний сайт розщеплення, з використанням ентенокінази. Розкриті способи включають етап контактування поліпептиду, що містить ентенокіназний сайт розщеплення, з ентенокіназою, при тому, що контактування поліпептиду з ентенокіназою призводить до специфічного розщеплення ентенокіназного сайту розщеплення. Використана ентенокіназа може бути ентенокіназою, закодованою молекулою полінуклеотиду, що розкрита в даному описі, яка продукуюна з використанням дріжджового експресійного конструкта, розкритого в даному описі, і/або продукуюною за допомогою експресії в дріжджовій клітині, яка розкрита у даному описі.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 демонструє графік середньої ферментної активності ентенокінази, отриманої з шести різних клітинних ліній дріжджів, що містять інтегровану касету ЕК, розкритих у даному описі.

Опис

Дріжджові системи експресії дають декілька переваг у якості систем продукування гетерологічного поліпептиду. По-перше, дріжджові клітини можуть давати значну біомасу при вирощуванні на ферментерах (>300 г/л вологої клітинної маси), забезпечуючи щільні культури для продукування бажаного поліпептиду у великих кількостях. По-друге, на відміну від прокаріотичних експресійних систем дріжджові системи експресії можуть коректно управляти пост-трансляційним фолдингом і іншими модифікаціями, специфічними для еукаріотичного поліпептиду, тим самим забезпечуючи збереження біологічної активності, функції і стабільності гетерологічного пептиду. По-третє, дріжджові системи експресії є рухомими і гнучкими, пропонуючи 1) позакромосомну або геномну експресію; 2) конститутивний або індукційний контроль експресії, і 3) можливість направляти експресію гетерологічного поліпептиду в специфічний клітинний або позаклітинний компартмент для полегшення виділення і очищення.

Даний опис розкриває покращену експресійну конструкцію, корисну для рентабельного продукування рекомбінантної ентенокінази в достатньо великих кількостях, корисних для комерційного використання. Ці результати можуть бути досягнуті використанням будь-якої розкритої генетично сконструйованої полінуклеотидної молекули, що кодує ентенокіназу. Клоновані в дріжджовий вектор експресії і введені в дріжджову клітину, ці сконструйовані молекули можуть продукувати значно більші кількості ентенокінази, ніж це можливо на сьогодні.

Таким чином, особливості даного опису охоплюють, зокрема, полінуклеотидну молекулу. Полінуклеотидна молекула, яка розкрита в даному описі, може бути одноланцюговою або дволанцюговою ДНК, виділеною з генома організму, рекомбінантно отриманою кДНК, хімічно синтезованою молекулою ДНК. Крім того, "виділена" полінуклеотидна молекула, як правило, є, по суті, вільною від інших клітинних матеріалів, коли її виділяють з джерела генома або отримують за допомогою рекомбінантних способів, або, по суті, вільною від хімічних попередників або інших хімічних речовин, коли її хімічно синтезують.

Особливості даного опису охоплюють, зокрема, полінуклеотидну молекулу, що кодує ентенокіназу. У даному описі, термін "ентенокіназа" є синонімом "ЕК" і позначає будь-який поліпептид, який може селективно розпізнавати і розщеплювати пентапептидну послідовність Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID № 1) при нестійкому хімічному зв'язку, що знаходиться за лізиновим залишком (DDDDK↓). У даному описі, терміном "селективно розпізнає і розщеплює", коли посилення робиться на ентенокіназу, позначають виборчу взаємодію ентенокінази з молекулою, що містить SEQ ID № 1, і розщеплення нестійкого хімічного зв'язку, що знаходиться за лізиновим залишком послідовності SEQ ID № 1, хоча по суті не взаємодіє з будь-якою іншою пентапептидною послідовністю, що знаходиться в молекулі, і не розщеплює її. Як така, ентенокіназа позначає нативний гетеродимерний глікопротеїн, що містить, приблизно, 82-140 кДа важкого ланцюга і, приблизно, 35-62 кДа легкого ланцюга, приєднаного за допомогою одиничного дисульфідного містка, а також каталітично активний фрагмент легкого ланцюга. Приклади створення полінуклеотидної молекули, що кодує ентенокіназу, описані в Прикладах 1, 2 і 4-6.

В одному варіанті здійснення винаходу, полінуклеотидна молекула, що кодує ентенокіназу, може бути SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом. У даному описі, терміном "комплемент" позначають полінуклеотидну молекулу, яка є антисмисловою молекулою в сенсі

молекули, що кодує ентерокіназу. Полінуклеотидна молекула, що кодує ентерокіназу, може включати полінуклеотидні ділянки, що кодують інші типи поліпептидних молекул, такі як, наприклад, очисні теги, сигнали клітинної секреції та/або сигнали субклітинної локалізації. Зразком полінуклеотидної молекули такого виду є SEQ ID № 6. Полінуклеотидна молекула, що кодує ентерокіназу, може також включати контрольні або регуляторні полінуклеотидні ділянки, які направляють або полегшують, наприклад, особливості транскрипції, трансляції та/або пост-трансляційної обробки.

В іншому варіанті здійснення винаходу, полінуклеотидна молекула, що кодує ентерокіназу, може бути нуклеотидним варіантом SEQ ID №4, SEQ ID № 6 або їх комплементом, за умови, що нуклеотидна зміна SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6 або їх комплементу не змінить амінокислотну послідовність ентерокінази, що кодується полінуклеотидним варіантом. Як такий, полінуклеотидний варіант SEQ ID № 4, розкритий у даному описі, кодує ентерокіназу SEQ ID № 5, і полінуклеотидний варіант SEQ ID № 6, розкритий у даному описі, кодує ентерокіназу SEQ ID № 7.

Згідно з аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула полінуклеотидного варіанту, що кодує ентерокіназу, може бути, наприклад, принаймні на 70 %, принаймні на 75 %, принаймні на 80 %, принаймні на 85 %, принаймні на 90 %, принаймні на 91 %, принаймні на 92 %, принаймні на 93 %, принаймні на 94 %, принаймні на 95 %, принаймні на 96 %, принаймні на 97 %, принаймні на 98 % або принаймні на 99 % ідентичною полінуклеотидній послідовності SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементу.

Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула полінуклеотидного варіанту, що кодує ентерокіназу, може мати, наприклад, від приблизно 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15, від приблизно 1 до приблизно 20, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 25, від приблизно 5 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 35, від приблизно 5 до приблизно 40, від приблизно 5 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 40, від приблизно 10 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 50, від приблизно 10 до приблизно 55, або від приблизно 10 до приблизно 60 несуміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом. Згідно з додатковими аспектами варіанту здійснення винаходу, молекула полінуклеотидного варіанту, що кодує ентерокіназу, може мати, наприклад, приблизно від 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15, від приблизно 1 до приблизно 20, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 25, від приблизно 5 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 35, від приблизно 5 до приблизно 40, від приблизно 5 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 40, від приблизно 10 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 50, від приблизно 10 до приблизно 55, або від приблизно 10 до приблизно 60 суміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом.

Будь-який з множини способів вирівнювання послідовностей може бути використаний для ідентифікації полінуклеотиду або поліпептиду, розкритих у даному описі, включаючи глобальні способи, локальні способи і гібридні способи, такі як, наприклад, способи сегментного підходу, не обмежуючись названими. Протоколи для визначення відсотка ідентичності є рутинними процедурами для спеціаліста в даній області техніки і розкриті в даному описі.

Глобальні способи вирівнюють послідовності від початку до кінця молекули і визначають краще вирівнювання шляхом додавання великої кількості індивідуальних пар залишків і накладення гепових штрафів. Способи включають, наприклад, CLUSTAL W, дивись, наприклад, Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); і інтерактивну рафінацію, дивись, наприклад, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996), але не обмежуються вказаними.

Локальні способи вирівнюють послідовності шляхом ідентифікації одного або більше консервативних мотивів, загальних для всіх послідовностей, що вводяться. Способи включають, наприклад, Match-box, дивись, наприклад, Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992); Gibbs sampling, дивись, наприклад, C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); ALIGN-M, дивись, наприклад, Ivo Van Walle et al., ALIGN-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics, 1428-1435 (2004), але не обмежуються перерахованими.

Гібридні способи об'єднують функціональні особливості як глобальних, так і локальних способів вирівнювання. Способи включають, наприклад, порівняння сегмент-до-сегменту, дивись, наприклад, Burkhard Morgenstern et al., Multiple DNA and Protein Sequence Alignment Based On Segment-To-Segment Comparison, 93(22) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 12098-12103 (1996); T-Coffee, дивись, наприклад, Cédric Notredame et al., T-Coffee: A Novel Algorithm for Multiple Sequence Alignment, 302(1) J. Mol. Biol. 205-217 (2000); MUSCLE, дивись, наприклад, Robert C. Edgar, MUSCLE: Multiple Sequence Alignment With High Score Accuracy and High Throughput, 32(5) Nucleic Acids Res. 1792-1797 (2004); і DIALIGN-T, дивись, наприклад, Amarendran R Subramanian et al., DIALIGN-T: An Improved Algorithm for Segment-Based Multiple Sequence Alignment, 6(1) BMC Bioinformatics 66 (2005).

Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула полінуклеотидного варіанту, що кодує ентерокіназу, може бути полінуклеотидним варіантом, який гібридизується з полінуклеотидною молекулою, що містить SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплемент, у жорстких умовах. Такі жорсткі умови відомі спеціалістам у даній області техніки і можуть бути знайдені, наприклад, у Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, включених у повному обов'язі в даний опис шляхом посилання. Необмежуючим прикладом жорстких (наприклад, суворо жорстких) умов гібридизації є гібридизація в 6х хлориді натрію/цитраті натрію (SSC) при, приблизно, 45 °C, з подальшим одноразовим або багаторазовим промиванням 0,2 x SSC, 0,1 % SDS при 50-65°C.

Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула полінуклеотидного варіанту, що кодує ентерокіназу, може бути полінуклеотидним варіантом, розкритим у Таблиці 1. Ця таблиця включає амінокислотну послідовність легкого ланцюга ентерокінази, кодони, що містять відкриту рамку зчитування полінуклеотидної ділянки послідовностей SEQ ID № 4 і SEQ ID № 6, що кодують фрагмент цього легкого ланцюга, варіанти кодонів, які можуть заміщати кодони SEQ ID № 4 і SEQ ID № 6. Згідно з аспектами даного варіанту здійснення цього винаходу, молекула варіанту полінуклеотиду, що кодує ентерокіназу, має, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 варіантних кодонів, показаних у Таблиці 1, які заміщають відповідні кодони, що присутні в SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула варіанту полінуклеотиду, що кодує ентерокіназу, має, наприклад, принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 варіантних кодонів з Таблиці 1, які заміщають відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула варіанту полінуклеотиду, що кодує ентерокіназу, має, наприклад, не більше ніж 1, не більше ніж 2, не більше ніж 3, не більше ніж 4, не більше ніж 5, не більше ніж 6, не більше ніж 7, не більше ніж 8, не більше ніж 9, не більше ніж 10, не більше ніж 11, не більше ніж 12, не більше ніж 13, не більше ніж 14, не більше ніж 15, не більше ніж 16, не більше ніж 17, не більше ніж 18, не більше ніж 19 або не більше ніж 20 варіантних кодонів, показаних у Таблиці 1, що заміщають відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

Таблиця 1

Нуклеїновокислотні послідовності ентерокінази

Амінокислота	I	V	G	G	S	D	S	R	E	G	A	W
Кодон	ATA	GTT	GGC	GGC	TCT	GAC	TCC	AGA	GAA	GGT	GCC	TGG
Варіант	ATT ATC	-	GGT GGA	GGT GGA	-	GAT	TCT	-	-	GGA	GCT	-
Амінокислота	P	W	V	V	A	L	Y	F	D	D	Q	Q
Кодон	CCA	TGG	GTC	GTT	GCC	TTA	TAC	TTT	GAT	GAT	CAA	CAG
Варіант	CCT	-	GTT	-	GCT	TTG	TAT	-	-	-	-	CAA
Амінокислота	V	C	G	A	S	L	V	S	R	D	W	L
Кодон	GTC	TGT	GGT	GCT	TCA	CTT	GTT	TCT	AGA	GAT	TGG	TTG
Варіант	GTT	-	GGA	-	TCT	TTG	-	-	-	-	-	-

Таблиця 1

Нуклеїновокислотні послідовності ентерокинази

Амінокислота	V	S	A	A	H	C	V	Y	G	R	N	M
Кодон	GTG	TCC	GCA	GCA	CAT	TGT	GTG	TAT	GGT	AGG	AAT	ATG
Варіант	GTT	TCT	GCT	GCT	-	-	GTT	TAC	GGA	AGA	CAA	-
Амінокислота	E	P	S	K	W	K	A	V	L	G	L	H
Кодон	GAG	CCT	TCA	AAG	TGG	AAA	GCT	GTA	TTG	GGG	TTG	CAT
Варіант	GAA	CCA	TCT	-	-	AAG	-	GTT	-	GGTGA	-	-
Амінокислота	M	A	S	N	L	T	S	P	Q	I	E	T
Кодон	ATG	GCC	TCT	AAC	CTT	ACA	AGT	CCA	CAA	ATT	GAA	ACT
Варіант	-	GCT	-	-	TTG	ACT	TCT	CCT	-	ATC	-	-
Амінокислота	R	L	I	D	Q	I	V	I	N	P	H	Y
Кодон	AGA	CTA	ATT	GAT	CAA	ATT	GTT	ATC	AAT	CCT	CAT	TAC
Варіант	-	TTG	ATC	-	-	ATC	-	ATT	AAC	CCA	-	-
Амінокислота	N	K	R	R	K	N	N	D	I	A	M	M
Кодон	AAT	AAG	CGT	AGG	AAA	AAC	AAT	GAC	ATA	GCA	ATG	ATG
Варіант	AAC	-	AGA	AGA	AAG	-	AAC	GAT	ATTA TC	GCT	-	-
Амінокислота	H	L	E	M	K	V	N	Y	T	D	Y	I
Кодон	CAC	TTG	GAG	ATG	AAA	GTT	AAC	TAC	ACA	GAC	TAC	ATC
Варіант	CAT	-	GAA	-	AAG	-	-	-	ACT	GAT	-	ATT
Амінокислота	Q	P	I	C	L	P	E	E	N	Q	V	F
Кодон	CAA	CCA	ATA	TGT	TTG	CCT	GAG	GAA	AAT	CAG	GTG	TTC
Варіант	-	CCT	ATTA TC	-	-	CCA	GAA	-	AAC	CAA	GTT	TTT
Амінокислота	P	P	G	R	I	C	S	I	A	G	W	G
Кодон	CCA	CCT	GGT	CGT	ATT	TGT	AGT	ATT	GCT	GGA	TGG	GGA
Варіант	CCT	CCA	GGA	AGA	ATC	-	TCT	ATC	-	GGT	-	GGT
Амінокислота	A	L	I	Y	Q	G	S	T	A	D	V	L
Кодон	GCC	CTG	ATC	TAC	CAA	GGA	TCT	ACC	GCT	GAC	GTA	TTA
Варіант	GCT	TTG	ATT	-	-	GGT	-	ACT	-	GAT	GTT	TTG
Амінокислота	Q	E	A	D	V	P	L	L	S	N	E	K
Кодон	CAA	GAG	GCA	GAT	GTT	CCT	CTG	CTG	TCC	AAC	GAG	AAA
Варіант	-	GAA	GCT	-	-	CCA	TTG	TTG	TCT	-	GAA	AAG
Амінокислота	C	Q	Q	Q	M	P	E	Y	N	I	T	E
Кодон	TGC	CAG	CAA	CAA	ATG	CCA	GAA	TAC	AAC	ATC	ACT	GAA
Варіант	-	CAA	-	-	-	CCT	-	-	-	ATT	-	-
Амінокислота	N	M	V	C	A	G	Y	E	A	G	G	V
Кодон	AAC	ATG	GTT	TGT	GCT	GGT	TAT	GAA	GCT	GGA	GGT	GTA
Варіант	-	-	-	-	-	GGA	TAC	-	-	GGT	GGA	GTT
Амінокислота	D	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	L	M
Кодон	GAT	TCA	TGC	CAG	GGA	GAT	TCA	GGC	GGT	CCT	CTA	ATG

Таблиця 1

Нуклеїновокислотні послідовності ентерокінази

Варіант	-	TCT	-	CAA	GGT	-	TCT	GGT GGA	GGA	CCA	TTG	-
Амінокислота	C	Q	E	N	N	R	W	L	L	A	G	V
Кодон	TGC	CAG	GAG	AAT	AAC	CGA	TGG	TTG	CTT	GCT	GGT	GTA
Варіант	-	CAA	GAA	AAC	-	AGA	-	-	TTG	-	GGA	GTT
Амінокислота	T	S	F	G	Y	Q	C	A	L	P	N	R
Кодон	ACG	AGT	TTT	GGA	TAT	CAA	TGC	GCT	TTA	CCT	AAC	CGT
Варіант	ACT	TCT	-	GGT	TAC	-	-	-	TTG	CCA	-	AGA
Амінокислота	P	G	V	Y	A	R	V	P	R	F	T	E
Кодон	CCA	GGG	GTC	TAT	GCA	AGA	GTC	CCA	AGA	TTC	ACC	GAG
Варіант	CCT	GGTG GA	GTT	TAC	GCT	-	GTT	CCT	-	TTT	ACT	GAA
Амінокислота	W	I	Q	S	F	L	H	*				
Кодон	TGG	ATT	CAA	TCT	TTT	CTG	CAC	TGA				
Варіант	-	ATC	-	-	-	TTG	CAT	TAA				

- У додаткових аспектах даного варіанту здійснення винаходу, полінуклеотидна молекула, що кодує ентерокіназу, може бути полінуклеотидним варіантом, розкритим у Таблиці 2. Ця таблиця включає амінокислотні послідовності легкого ланцюга ентерокінази, кодони, що містять відкриту
- 5 рамку зчитування полінуклеотидної ділянки послідовностей SEQ ID № 4 і SEQ ID № 6, що кодують цей фрагмент легкого ланцюга, і варіанти кодонів, які можуть заміщати кодони SEQ ID № 4 і SEQ ID № 6. Згідно з аспектами даного варіанту здійснення цього винаходу, молекула полінуклеотидного варіанту, що кодує ентерокіназу, має, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 варіантних кодонів з Таблиці 2, що заміщають
- 10 відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула варіантного полінуклеотиду, що кодує ентерокіназу, має, наприклад, принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або
- 15 принаймні 20 варіантних кодонів з Таблиці 2, що заміщають відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, молекула варіантного полінуклеотиду, що кодує ентерокіназу, має, наприклад, не більше ніж 1, не більше ніж 2, не більше ніж 3, не більше ніж 4, не більше ніж 5, не більше ніж 6, не більше ніж 7, не більше ніж 8, не більше ніж 9, не більше ніж 10, не більше ніж 11, не більше ніж 12, не
- 20 більше ніж 13, не більше ніж 14, не більше ніж 15, не більше ніж 16, не більше ніж 17, не більше ніж 18, не більше ніж 19 або не більше ніж 20 варіантних кодонів із Таблиці 2, що заміщають відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 і SEQ ID № 6.

Таблиця 2

Нуклеїновокислотні послідовності ентерокінази

Амінокислота	I	V	G	G	S	D	S	R	E	G	A	W
Кодон	ATA	GTT	GGC	GGC	TCT	GAC	TCC	AGA	GAA	GGT	GCC	TGG
Варіант	ATT	-	GGT	GGT	-	GAT	TCT	-	-	-	GCT	-
Амінокислота	P	W	V	V	A	L	Y	F	D	D	Q	Q
Кодон	CCA	TGG	GTC	GTT	GCC	TTA	TAC	TTT	GAT	GAT	CAA	CAG
Варіант	-	-	GTT	-	GCT	TTG	TAT	-	-	-	-	CAA
Амінокислота	V	C	G	A	S	L	V	S	R	D	W	L

Таблиця 2

Нуклеїновокислотні послідовності ентерокинази

Кодон	GTC	TGT	GGT	GCT	TCA	CTT	GTT	TCT	AGA	GAT	TGG	TTG
Варіант	GTT	-	-	-	TCT	TTG	-	-	-	-	-	-
Амінокислота	V	S	A	A	H	C	V	Y	G	R	N	M
Кодон	GTG	TCC	GCA	GCA	CAT	TGT	GTG	TAT	GGT	AGG	AAT	ATG
Варіант	GTT	TCT	GCT	GCT	-	-	GTT	TAC	-	AGA	CAA	-
Амінокислота	E	P	S	K	W	K	A	V	L	G	L	H
Кодон	GAG	CCT	TCA	AAG	TGG	AAA	GCT	GTA	TTG	GGG	TTG	CAT
Варіант	GAA	CCA	TCT	-	-	AAG	-	GTT	-	GGT	-	-
Амінокислота	M	A	S	N	L	T	S	P	Q	I	E	T
Кодон	ATG	GCC	TCT	AAC	CTT	ACA	AGT	CCA	CAA	ATT	GAA	ACT
Варіант	-	GCT	-	-	TTG	ACT	TCT	-	-	-	-	-
Амінокислота	R	L	I	D	Q	I	V	I	N	P	H	Y
Кодон	AGA	CTA	ATT	GAT	CAA	ATT	GTT	ATC	AAT	CCT	CAT	TAC
Варіант	-	TTG	-	-	-	-	-	ATT	AAC	CCA	-	-
Амінокислота	N	K	R	R	K	N	N	D	I	A	M	M
Кодон	AAT	AAG	CGT	AGG	AAA	AAC	AAT	GAC	ATA	GCA	ATG	ATG
Варіант	AAC	-	AGA	AGA	AAG	-	AAC	GAT	ATT	GCT	-	-
Амінокислота	H	L	E	M	K	V	N	Y	T	D	Y	I
Кодон	CAC	TTG	GAG	ATG	AAA	GTT	AAC	TAC	ACA	GAC	TAC	ATC
Варіант	CAT	-	GAA	-	AAG	-	-	-	ACT	GAT	-	ATT
Амінокислота	Q	P	I	C	L	P	E	E	N	Q	V	F
Кодон	CAA	CCA	ATA	TGT	TTG	CCT	GAG	GAA	AAT	CAG	GTG	TTC
Варіант	-	-	ATT	-	-	CCA	GAA	-	AAC	CAA	GTT	TTT
Амінокислота	P	P	G	R	I	C	S	I	A	G	W	G
Кодон	CCA	CCT	GGT	CGT	ATT	TGT	AGT	ATT	GCT	GGA	TGG	GGA
Варіант	-	CCA	-	AGA	-	-	TCT	-	-	GGT	-	GGT
Амінокислота	A	L	I	Y	Q	G	S	T	A	D	V	L
Кодон	GCC	CTG	ATC	TAC	CAA	GGA	TCT	ACC	GCT	GAC	GTA	TTA
Варіант	GCT	TTG	ATT	-	-	GGT	-	ACT	-	GAT	GTT	TTG
Амінокислота	Q	E	A	D	V	P	L	L	S	N	E	K
Кодон	CAA	GAG	GCA	GAT	GTT	CCT	CTG	CTG	TCC	AAC	GAG	AAA
Варіант	-	GAA	GCT	-	-	CCA	TTG	TTG	TCT	-	GAA	AAG
Амінокислота	C	Q	Q	Q	M	P	E	Y	N	I	T	E
Кодон	TGC	CAG	CAA	CAA	ATG	CCA	GAA	TAC	AAC	ATC	ACT	GAA
Варіант	-	CAA	-	-	-	-	-	-	-	ATT	-	-
Амінокислота	N	M	V	C	A	G	Y	E	A	G	G	V
Кодон	AAC	ATG	GTT	TGT	GCT	GGT	TAT	GAA	GCT	GGA	GGT	GTA
Варіант	-	-	-	-	-	-	TAC	-	-	GGT	-	GTT
Амінокислота	D	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	L	M
Кодон	GAT	TCA	TGC	CAG	GGA	GAT	TCA	GGC	GGT	CCT	CTA	ATG

Таблиця 2

Нуклеїновокислотні послідовності ентерокинази

Варіант	-	TCT	-	CAA	GGT	-	TCT	GGT	-	CCA	TTG	-
Амінокислота	C	Q	E	N	N	R	W	L	L	A	G	V
Кодон	TGC	CAG	GAG	AAT	AAC	CGA	TGG	TTG	CTT	GCT	GGT	GTA
Варіант	-	CAA	GAA	AAC	-	AGA	-	-	TTG	-	-	GTT
Амінокислота	T	S	F	G	Y	Q	C	A	L	P	N	R
Кодон	ACG	AGT	TTT	GGA	TAT	CAA	TGC	GCT	TTA	CCT	AAC	CGT
Варіант	ACT	TCT	-	GGT	TAC	-	-	-	TTG	CCA	-	AGA
Амінокислота	P	G	V	Y	A	R	V	P	R	F	T	E
Кодон	CCA	GGG	GTC	TAT	GCA	AGA	GTC	CCA	AGA	TTC	ACC	GAG
Варіант	-	GGT	GTT	TAC	GCT	-	GTT	-	-	TTT	ACT	GAA
Амінокислота	W	I	Q	S	F	L	H	*				
Кодон	TGG	ATT	CAA	TCT	TTT	CTG	CAC	TGA				
Варіант	-	-	-	-	-	TTG	CAT	TAA				

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу полінуклеотидна молекула, що кодує ентерокиназу, може бути усіченим фрагментом SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх нуклеотидного варіанту. У даному описі, терміном “усічений фрагмент SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого з його нуклеотидних варіантів” позначають видалення нуклеотидів з 710 нуклеотидної послідовності, сформованої SEQ ID № 4 або її нуклеотидним варіантом, або з 953 нуклеотидної послідовності, сформованої SEQ ID № 6 або її нуклеотидним варіантом. Можуть бути видалені нуклеотиди з 5'-кінця, 3'-кінця або 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту.

Згідно з аспектами даного варіанту здійснення цього винаходу 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 нуклеотидів видалені з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19, принаймні 20, принаймні 25, принаймні 30, принаймні 35, принаймні 40, принаймні 45 або принаймні 50 нуклеотидів видалено з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, не більше ніж 1, не більше ніж 2, не більше ніж 3, не більше ніж 4, не більше ніж 5, не більше ніж 6, не більше ніж 7, не більше ніж 8, не більше ніж 9, не більше ніж 10, не більше ніж 11, не більше ніж 12, не більше ніж 13, не більше ніж 14, не більше ніж 15, не більше ніж 16, не більше ніж 17, не більше ніж 18, не більше ніж 19, не більше ніж 20, не більше ніж 25, не більше ніж 30, не більше ніж 35, не більше ніж 40, не більше ніж 45 або не більше ніж 50 видалені з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу.

Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 кодонів видалено з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту, або їх комплексу. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 кодонів видалено з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, не більше ніж 1, не більше ніж 2, не більше ніж 3, не більше ніж 4, не більше ніж 5, не більше ніж 6, не більше ніж 7, не більше ніж 8, не більше ніж 9, не більше ніж 10, не більше ніж 11, не більше ніж 12, не більше ніж 13, не більше ніж 14, не більше ніж 15, не більше ніж 16, не більше ніж 17, не більше ніж 18, не більше ніж 19, не більше ніж 20, не більше ніж 25, не більше ніж 30, не більше ніж 35, не більше ніж 40, не більше ніж 45 або не більше ніж 50 видалені з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу.

10, не більше ніж 11, не більше ніж 12, не більше ніж 13, не більше ніж 14, не більше ніж 15, не більше ніж 16, не більше ніж 17, не більше ніж 18, не більше ніж 19 або не більше ніж 20 кодонів видалено з 5'-кінця, 3'-кінця або з 5'-кінця і 3'-кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплементу.

Варіанти даного опису розкривають, зокрема, полінуклеотидну молекулу, що містить дріжджовий вектор експресії. Для експресування полінуклеотидної молекули, що кодує ЕК, може бути використаний широкий вибір дріжджових векторів експресії, включаючи експресійний вектор *Pichia pastoris*, експресійний вектор *Pichia methanolica*, експресійний вектор *Pichia angusta*, експресійний вектор *Schizosaccharomyces pombe*, експресійний вектор *Saccharomyces cerevisiae* і експресійний вектор *Yarrowia lipolytica*, не обмежуючись перерахованими. Приклади дріжджових векторів експресії включають експресійний вектор pGal-MF (DualsystemsBiotech, AG, Schlieren, CH), експресійний вектор pMET (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), експресійний вектор PICHIAPINK (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), експресійний вектор pPICZ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), експресійний вектор pPpT4-альфа (Ingenza, Ltd., Midlothian, UK), експресійний вектор pTEF-MF (DualsystemsBiotech, AG, Schlieren, CH), експресійний вектор pYES (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), не обмежуючись перерахованими.

Дріжджовий вектор експресії, як правило, включає контролюючі або регулюючі полінуклеотидні ділянки, які направляють або полегшують, наприклад, особливості реплікації, інтеграції, транскрипції, трансляції та/або пост-трансляційної обробки. Наприклад, дріжджовий вектор експресії може включати конститутивний промотор і енхансерні елементи та/або індукцибельний промотор і енхансерні елементи, що використовуються для наряду експресії ЕК. Необмежуваним прикладом конститутивного вектора експресії є вектор, який використовує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназний (GAP) промотор, щоб направляти продукування ЕК. Необмежуваним прикладом індукцибельного вектора експресії є вектор, який використовує альдегідоксидазний-1 промотор (AOX1) з метанолом як індуктором. У будь-якому випадку можуть бути досягнуті високі рівні експресії, до кількох грам на літр отриманого продукту. Наприклад, в індуктованих метанолом дріжджових клітинах, AOX1 може складати 30 % усього розчинного білка. Штами, позбавлені гена AOX1 (звані також штамами MUTS) можуть як і раніше індукуватись метанолом, так як вони експресують ген алкогольоксидази-2 (AOX2), але зростають вони повільніше, ніж штами дикого типу, коли метанол використовують як основне джерело вуглецю. Проте, замість використання енергії і ресурсів переважно для виробництва протеїну AOX1, у штаммах MUTS сила промотора AOX1, в основному, може бути направлена на виробництво рекомбінантного протеїну. До того ж, можуть бути використані нижчі рівні метанолу.

Дріжджовий вектор експресії може включати полінуклеотидні ділянки, що кодують інші типи поліпептидних молекул, таких як, наприклад, очисні теги, сигнали клітинної секреції та/або сигнали субклітинної локалізації. Такі полінуклеотидні ділянки зазвичай функціонально зв'язані з ЕК у вигляді злитого поліпептиду. Приклади очисних тегів включають гістидиновий тег, тус тег, V5 тег, не обмежуючись названими. Приклади сигнальних послідовностей включають послідовності, які направляють ЕК до цитоплазми клітин, целлюлярних органел, таких як пероксисоми, або в позаклітинне середовище, проте не обмежуються ними.

Варіанти даного опису розкривають, зокрема, полінуклеотидну молекулу, що містить дріжджовий експресійний конструкт. Дріжджовий експресійний конструкт містить полінуклеотидну молекулу, що кодує ЕК, як розкрито в даному описі, функціонально зв'язану з дріжджовим вектором експресії, як розкрито в даному описі. Приклади дріжджового експресійного конструкту описані в Прикладах 2 і 4-6.

Варіанти даного опису розкривають, зокрема, введення в дріжджову клітину полінуклеотидної молекули, розкритої в даному описі. Полінуклеотидна молекула, введена в клітину, може міститись у ній тимчасово або стабільно. Полінуклеотидні молекули, що стабільно містяться, можуть бути позахромосомними і реплікуватись автономно, або бути інтегрованими в хромосомний матеріал клітини і реплікуватись неавтономно.

Передбачається, що може бути використаний будь-який із способів для введення полінуклеотидної молекули, розкритої в даному описі, у клітину. Способи, що використовуються для введення нуклеїнових кислот молекули в клітину, включають хімічно опосередковану трансфекцію, таку як, наприклад, опосередковану фосфатом кальцію, опосередковану діетиламіноексестраном (DEAE), опосередковану ліпідами, опосередковану поліетиленіміном (PEI), опосередковану полілізином і полібренном; фізично опосередковану трансфекцію, таку як, наприклад, доставка біолістических часток, мікроін'єкція, протопластне злиття і електропорація; опосередковану вірусом трансфекцію, таку як, наприклад, опосередковану ретровірусом трансфекцію, але не обмежуються перерахованими. Спеціалісту зрозуміло, що вибір

специфічного способу для введення експресійного конструкта в клітину залежатиме, зокрема, від того, чи буде містити клітина експресійний конструкт тимчасово або стабільно. Ці протоколи є рутинними процедурами, відомими для спеціаліста з рівня техніки або з даного опису, дивись, наприклад, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, pp. 16.1-16.62 (Sambrook & Russell, eds., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol. 3, 3rd ed. 2001). Приклади введення дріжджового експресійного конструкта, розкритого в даному описі, у дріжджову клітину описані в Прикладах 2 і 4-6.

Варіанти даного опису розкривають, зокрема, дріжджову клітину, що містить дріжджовий експресійний конструкт, що включає полінуклеотидну молекулу, що кодує ЕК, як розкрито в даному описі. Згідно з одним аспектом даного варіанту здійснення цього винаходу дріжджова клітина тимчасово містить дріжджовий експресійний конструкт, що включає полінуклеотидну молекулу, що кодує ЕК, як розкрито в даному описі. Згідно з іншим аспектом даного варіанту здійснення цього винаходу, дріжджова клітина стабільно містить дріжджовий експресійний конструкт, що включає полінуклеотидну молекулу, що кодує ЕК, як розкрито в даному описі. Згідно з аспектами даного варіанту здійснення цього винаходу, дріжджова клітина є клітиною штаму *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* або *Yarrowia lipolytica*. Згідно з аспектами даного варіанту здійснення даного винаходу, дріжджовий експресійний конструкт є експресійним вектором *Pichia pastoris*, експресійним вектором *Pichia methanolica*, експресійним вектором *Pichia angusta*, експресійним вектором *Schizosaccharomyces pombe*, експресійним вектором *Saccharomyces cerevisiae* або експресійним вектором *Yarrowia lipolytica*. Згідно з додатковими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, полінуклеотидна молекула, що кодує ЕК, є SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-яким їх нуклеотидним варіантом або комплементом.

Варіанти даного опису розкривають, зокрема, експресування ЕК з полінуклеотидної молекули, розкритої в даному описі, з використанням дріжджової експресійної системи. Експресування полінуклеотидної молекули з використанням дріжджової експресійної системи може включати будь-яку з ряду характеристик, що включають індукцибельну експресію, неіндукцибельну експресію, конститутивну експресію, опосередковану вірусом експресію, стабільно інтегровану експресію і короточасну експресію, але не обмежуються перерахованими. Ці протоколи є рутинними процедурами, відомими для спеціаліста з рівня техніки і з даного опису. Приклади дріжджової експресійної системи включають експресійний набір EASYSELECT™ *Pichia* (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), експресійний набір EASYSELECT™ ECHO™ *Pichia* (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), експресійний набір *Pichia methanolica* (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), секретуючий протеїн набір PICHAPINK™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), набір експресійного вектора YES-ECHO™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) і експресійну систему SPECTRA™ *S. pombe* (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), але не обмежуються названими. Приклади експресування ЕК з полінуклеотидної молекули, розкритої в даному описі, з використанням дріжджової експресійної системи описані в Прикладах 2-6.

В одному варіанті здійснення винаходу, кількість ЕК, експресованої з дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, збільшена порівняно з кількістю ЕК, експресованої з SEQ ID № 2.

Згідно з аспектами даного варіанту здійснення винаходу, кількість ЕК, експресованої з дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, збільшена, наприклад, принаймні в 0,5 разів, принаймні в 1 раз, принаймні в 1,5 рази, принаймні в 2 рази, принаймні в 3 рази, принаймні в 4 рази, принаймні в 5 разів, принаймні в 6 разів, принаймні в 7 разів, принаймні в 8 разів, принаймні в 9 разів, принаймні в 10 разів, принаймні в 15 разів, принаймні в 20 разів, принаймні в 25 разів, принаймні в 30 разів, принаймні в 35 разів або принаймні в 40 разів порівняно з кількістю ЕК, експресованої з SEQ ID № 2. Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, кількість ЕК, експресованої з дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, збільшена, наприклад, від приблизно 1 разу до приблизно 5 разів, від приблизно 1 разу до приблизно 10 разів, від приблизно 1 разу до приблизно 15 разів, від приблизно 1 разу до приблизно 20 разів, від приблизно 1 разу до приблизно 25 разів порівняно з кількістю ЕК, експресованої з SEQ ID № 2.

Згідно з іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, кількість ЕК, експресованої з дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, складає, від приблизно 100 мг/л до приблизно 30 г/л. Згідно з аспектами даного варіанту здійснення винаходу, кількість ЕК,

експресованої з дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, може бути, наприклад, принаймні 100 мг/л, принаймні 500 мг/л, принаймні 1 г/л, принаймні 1,5 г/л, принаймні 2,5 г/л, принаймні 5 г/л, принаймні 7,5 г/л, принаймні 10 г/л, принаймні 12,5 г/л, принаймні 15 г/л, принаймні 20 г/л, принаймні 25 г/л або принаймні 30 г/л. Згідно з ще іншими аспектами даного варіанту здійснення винаходу, кількість ЕК, експресованої з дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, може бути від, наприклад, приблизно 100 мг/л до приблизно 5 г/л, від приблизно 100 мг/л до приблизно 10 г/л, від приблизно 100 мг/л до приблизно 15 г/л, від приблизно 500 мг/л до приблизно 5 г/л, від приблизно 500 мг/л до приблизно 10 г/л, від приблизно 500 мг/л до приблизно 15 г/л, від приблизно 1 г/л до приблизно 5 г/л, від приблизно 1 г/л до приблизно 10 г/л, від приблизно 1 г/л до приблизно 15 г/л, від приблизно 1 г/л до приблизно 20 г/л, від приблизно 5 г/л до приблизно 10 г/л, від приблизно 5 г/л до приблизно 15 г/л, від приблизно 5 г/л до приблизно 20 г/л, від приблизно 5 г/л до приблизно 25 г/л, від приблизно 5 г/л до приблизно 30 г/л.

ЕК, експресована з дріжджового експресійного конструкта, розкритого в даному описі, може бути очищена від дріжджових клітин або культурального середовища з використанням будь-якого з ряду відомих способів. Приклади способів очищення включають осадження сульфатом амонію або етанолом, кислу екстракцію, іонообмінну хроматографію, фосфоцелюлозну хроматографію, лецитинову хроматографію, афінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, ексклюзійну хроматографію, гель-фільтраційну хроматографію, адсорбційну хроматографію, гідроксиапатитну хроматографію, рідинну хроматографію швидкого розділення (FPLC) і високоефективну рідинну хроматографію (HPLC), але не обмежуються перерахованими. Зв'язуючі частки цільового пептиду, що представляє інтерес, можуть бути приєднані до будь-якої з ряду речовин, включаючи смоли, агарозу і магнітні кульки, не обмежуючись перерахованими. Крім того, може бути використаний будь-який із способів обробки, включаючи обробку по партіях або з використанням колонок з подачею самопливом. Для забезпечення відновлення функціонально активного BoNT/A, кодованого нуклеїновими молекулами, розкритими в даному описі, необхідним також може бути рефолдинг протеїну. Приклади специфічних протоколів для очищення і відновлення протеїнів описані, наприклад, John Abelson et al., *Guide to Protein Purification*, (Academic Press, 1990), *Protein Purification: Principles and Practice*, (Robert K. Scopes et al. eds., Springer Verlag, 3rd ed. 1994), *Protein Purification Techniques: A Practical Approach*, (Simon Roe ed., Oxford University Press, 2nd ed. 2001), *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, supra, (2001), Ian M. Rosenberg, *Protein Analysis & Purification: Benchtop Techniques*, (Springer Verlag, 2002), але не обмежуються ними. Ці протоколи є рутинними процедурами, відовими для спеціаліста з рівня техніки та з даного опису.

Кількість ЕК може бути виміряна під час експресії ЕК, після завершення експресії ЕК та/або після очищення ЕК з використанням будь-якого з ряду відомих способів. Приклади способів протеїнових вимірів включають гель-електрофорез і фарбування протеїну, вестерн-блоттинг, ELISA, мічення протеїнів, УФ абсорбцію, метод Лоурі, біуретовий метод, метод Сміта з міддю/біцинхолоїновою кислотою (BCA), метод Бредфорда, але не обмежуються ними, дивись, наприклад, Christine V. Sapan et al., *Colorimetric Protein Assay Techniques*, 29(2) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 99-108 (1999).

Особливості даного опису розкривають, зокрема, способи розщеплення поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК з використанням ЕК. Згідно з одним варіантом здійснення винаходу, спосіб розщеплення поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, включає етап контактування поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, з ЕК, продукуюваною за допомогою експресії дріжджового експресійного конструкта, що містить SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, або будь-який усічений варіант у дріжджових клітинах, де контактування рекомбінантного поліпептиду з ентерокиназою призводить до специфічного розщеплення сайту розщеплення ЕК. Згідно з одним аспектом даного варіанту втілення винаходу сайт розщеплення ЕК є SEQ ID № 1. Поліпептид може природним чином містити сайт розщеплення ЕК або може бути рекомбінантним поліпептидом, генетично сконструйованим, щоб містити сайт розщеплення ЕК.

Особливості даного опису розкривають, зокрема, способи отримання поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, з використанням ЕК. В одному з варіантів здійснення даного винаходу спосіб отримання поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, включає етап контактування поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, з ентерокиназою, яка продукується шляхом експресії дріжджового експресійного конструкта, що містить SEQ ID № 4,

SEQ ID № 6 або будь-який їх полінуклеотидний варіант, або будь-який їх усічений варіант, у дріжджових клітинах, де контактування рекомбінантного поліпептиду з ентерокиназою призводить до специфічного розщеплення сайту розщеплення ЕК. Згідно з одним з аспектів даного варіанту здійснення винаходу, сайт розщеплення ЕК є SEQ ID № 1. Поліпептид може природним чином містити сайт розщеплення ЕК або може бути рекомбінантним поліпептидом, генетично сконструйованим, щоб містити сайт розщеплення ЕК.

Способи використання ЕК для розщеплення або отримання поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, можуть бути проведені з використанням стандартного *in vitro* способу протеолітичного розщеплення. Наприклад, поліпептид, що містить сайт розщеплення ЕК, додають у реакційну суміш, що містить 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ і ЕК, отриману способом, розкритим у даному описі, і інкубують при від приблизно 20°C до приблизно 22°C протягом від приблизно 2 годин до приблизно 16 годин. Об'єм розщепленого або отриманого таким чином поліпептиду може бути оцінений з використанням стандартних процедур, таких як, наприклад, аналіз SDS-PAGE, імунний вестерн-блоттинг або ELISA, або аналіз активності поліпептиду. Розщеплений або отриманий поліпептид також може бути очищений з використанням стандартних процедур. Способи, корисні для розщеплення або отримання поліпептиду, що містить сайт розщеплення ЕК, описані, наприклад, у публікаціях Ogiwara, et al., Modified Enteropeptidase Protein, US 8,013,137; La Vallie, Cloning of Enterokinase and Method of Use, US 6,746,859, що включені у повному обсязі в даний опис шляхом посилання.

Особливості опису даного винаходу можуть бути описані таким чином:

1. Виділена полінуклеотидна молекула, що містить SEQ ID № 4, SEQ ID № 6, їх полінуклеотидний варіант або їх усічений варіант і будь-який їх комплемент.

2. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де полінуклеотидний варіант принаймні на 70 %, принаймні на 75 %, принаймні на 80 %, принаймні на 85 %, принаймні на 90 %, принаймні на 91 %, принаймні на 92 %, принаймні на 93 %, принаймні на 94 %, принаймні на 95 %, принаймні на 96 %, принаймні на 97 %, принаймні на 98 % або принаймні на 99 % ідентичний полінуклеотидній послідовності SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементу.

3. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де полінуклеотидний варіант має від приблизно 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15, від приблизно 1 до приблизно 20, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 25, від приблизно 5 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 35, від приблизно 5 до приблизно 40, від приблизно 5 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 40, від приблизно 10 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 50, від приблизно 10 до приблизно 55, або від приблизно 10 до приблизно 60 несуміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом.

4. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де полінуклеотидний варіант має від приблизно 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15, від приблизно 1 до приблизно 20, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 25, від приблизно 5 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 35, від приблизно 5 до приблизно 40, від приблизно 5 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 40, від приблизно 10 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 50, від приблизно 10 до приблизно 55 або від приблизно 10 до приблизно 60 суміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом.

5. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де полінуклеотидний варіант гібридується з полінуклеотидною молекулою, що містить SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплемент у жорстких умовах.

6. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де полінуклеотидний варіант має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 варіантних кодонів з Таблиці 1, що заміщують відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

7. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де полінуклеотидний варіант має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 варіантних кодонів з Таблиці 2, що заміщують відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

8. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де усічений варіант має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19, принаймні 20, принаймні 25, принаймні 30, принаймні 35, принаймні 40, принаймні 45 або принаймні 50 нуклеотидів, видалених з 5'- кінця, 3'- кінця або з 5'- кінця і 3'- кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу.

9. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 1, де усічений варіант має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 кодонів, видалених з 5'- кінця, 3'- кінця або з 5'- кінця і 3'- кінця послідовностей SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або комплексу.

10. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантами здійснення 1-9, де виділена полінуклеотидна молекула є дріжджовим вектором експресії.

11. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 10, де дріжджовим вектором експресії є експресійний вектор *Pichia pastoris*, експресійний вектор *Pichia methanolica*, експресійний вектор *Pichia angusta*, експресійний вектор *Schizosaccharomyces pombe*, експресійний вектор *Saccharomyces cerevisiae* і експресійний вектор *Yarrowia lipolytica*.

12. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 10 або 11, де дріжджовий вектор експресії включає конститутивний промотор, конститутивний енансер, індукцйбельний промотор, індукцйбельний енансер або будь-яку їх комбінацію, які направляють експресію полінуклеотидної молекули згідно з варіантами здійснення 1-9.

13. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 12, де індукцйбельний промотор є промотором АОХ1 (альдегідоксидаза 1).

14. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантами здійснення 10-14, де дріжджовий вектор експресії включає полінуклеотидну ділянку, що кодує сигнальну послідовність, яка направляє ЕК, кодовану полінуклеотидною молекулою згідно з варіантами здійснення 1-9, до специфічних клітинних або позаклітинних компартментів.

15. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантами здійснення 10-14, де дріжджовий вектор експресії включає полінуклеотидну ділянку, що кодує сигнальну послідовність, яка направляє ЕК, кодовану полінуклеотидною молекулою згідно з варіантами здійснення 1-9, у клітинну цитоплазму, клітинні органели або позаклітинне культуральне середовище.

16. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантом здійснення 14 або 15, де сигнальна послідовність є пептидом фактора альфа.

17. Виділена полінуклеотидна молекула згідно з варіантами здійснення 1-9, де виділена полінуклеотидна молекула є дріжджовим експресійним конструктом.

18. Дріжджовий експресійний конструкт, що містить дріжджовий вектор експресії і полінуклеотидну молекулу, яка містить SEQ ID № 4, SEQ ID № 6, їх полінуклеотидний варіант або усічений варіант, або будь-який їх комплемент.

19. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 18, де полінуклеотидний варіант принаймні на 70 %, принаймні на 75 %, принаймні на 80 %, принаймні на 85 %, принаймні на 90 %, принаймні на 91 %, принаймні на 92 %, принаймні на 93 %, принаймні на 94 %, принаймні на 95 %, принаймні на 96 %, принаймні на 97 % принаймні на 98 % або принаймні на 99 % ідентичний полінуклеотидній послідовності SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементу.

20. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 18, де полінуклеотидний варіант має від приблизно 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15, від приблизно 1 до приблизно 20, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 25, від приблизно 5 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 35, від приблизно 5 до приблизно 40, від приблизно 5 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 40, від приблизно 10 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 50, від приблизно 10 до приблизно 55 або від приблизно 10 до приблизно 60 несуміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом.

21. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 18, де полінуклеотидний варіант має від приблизно 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15, від приблизно 1 до приблизно 20, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 25, від приблизно 5 до приблизно 30, від приблизно 5 до приблизно 35, від приблизно 5 до приблизно 40, від приблизно 5 до приблизно 45, від приблизно 5 до приблизно 50, від приблизно 5 до приблизно 55 або від приблизно 5 до приблизно 60 несуміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом.

45, від приблизно 10 до приблизно 40, від приблизно 10 до приблизно 45, від приблизно 10 до приблизно 50, від приблизно 10 до приблизно 55 або від приблизно 10 до приблизно 60 суміжних нуклеотидних заміщень порівняно з SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплементом.

22. Дріжджовий експресійний конструкт, згідно з варіантом здійснення 18, де
5 полінуклеотидний варіант гібридується з полінуклеотидною молекулою, що містить SEQ ID № 4, SEQ ID № 6 або їх комплемент, у жорстких умовах.

23. Дріжджовий експресійний конструкт, згідно з варіантом здійснення 18, де
10 полінуклеотидний варіант має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 варіантних кодонів з Таблиці 1, що заміщають відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

24. Дріжджовий експресійний конструкт, згідно з варіантом здійснення 18, де
15 полінуклеотидний варіант має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20 варіантних кодонів з Таблиці 2, що заміщають відповідний кодон, присутній у SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

25. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 18, де усічений варіант
20 має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19, принаймні 20, принаймні 25, принаймні 30, принаймні 35, принаймні 40, принаймні 45 або принаймні 50 нуклеотидів, видалених з 5'-кінця, 3'-кінця, або 5'-кінця і 3'-кінця послідовності SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або будь-якого їх комплементу.

26. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 18, де усічений варіант
має принаймні 1, принаймні 2, принаймні 3, принаймні 4, принаймні 5, принаймні 6, принаймні 7, принаймні 8, принаймні 9, принаймні 10, принаймні 11, принаймні 12, принаймні 13, принаймні 14, принаймні 15, принаймні 16, принаймні 17, принаймні 18, принаймні 19 або принаймні 20
30 кодонів, видалених з 5'-кінця, 3'-кінця, або 5'-кінця і 3'-кінця послідовності SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6 або будь-якого їх нуклеотидного варіанту або будь-якого їх комплементу.

27. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантами здійснення 18-26, де дріжджовим
вектором експресії є експресійний вектор *Pichia pastoris*, експресійний вектор *Pichia methanolica*,
експресійний вектор *Pichia angusta*, експресійний вектор *Schizosaccharomyces pombe*,
35 експресійний вектор *Saccharomyces cerevisiae* і експресійний вектор *Yarrowia lipolytica*.

28. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 27, де дріжджовий
вектор експресії включає конститутивний промотор, конститутивний енхансер, індукцибельний
промотор, індукцибельний енхансер або будь-яку їх комбінацію, які направляють експресію
полінуклеотидної молекули, згідно з варіантами здійснення 1-9.

29. Дріжджовий експресійний конструкт, згідно з варіантом здійснення 28, де індукцибельний
40 промотор є промотором AOX1 (альдегідоксидаза 1).

30. Дріжджовий експресійний конструкт, згідно з варіантами здійснення 27-29, де
дріжджовий вектор експресії включає полінуклеотидну ділянку, що кодує сигнальну
45 послідовність, яка направляє ЕК, кодовану полінуклеотидною молекулою згідно з варіантами здійснення 1-9, до специфічних клітинних і позаклітинних компартментів.

31. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантами здійснення 27-29, де дріжджовий
вектор експресії включає полінуклеотидну ділянку, що кодує сигнальну послідовність, яка
направляє ЕК, кодовану полінуклеотидною молекулою згідно з варіантами здійснення 1-9, у
клітинну цитоплазму, целюлярні органели або позаклітинне культуральне середовище.

32. Дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантом здійснення 30 або 31, де
50 сигнальна послідовність є пептидом фактора альфа.

33. Дріжджова клітина, що містить полінуклеотид згідно з варіантами здійснення 1-17.

34. Дріжджова клітина згідно з варіантом здійснення 33, де експресійний конструкт
тимчасово міститься в дріжджовій клітині.

35. Дріжджова клітина згідно з варіантом здійснення 33, де експресійний конструкт стабільно
55 міститься в дріжджовій клітині.

37. Дріжджова клітина згідно з варіантами здійснення 33-35, де дріжджова клітина включає у
себе клітину штаму *Pichia pastoris*, клітину штаму *Pichia methanolica*, клітину штаму *Pichia*
60 *angusta*, клітину штаму *Schizosaccharomyces pombe*, клітину штаму *Saccharomyces cerevisiae*
або клітину штаму *Yarrowia lipolytica*.

38. Дріжджова клітина згідно з варіантами здійснення 33-35, де дріжджова клітина є клітиною штаму *Pichia pastoris*.

39. Дріжджова клітина, що містить дріжджовий експресійний конструкт згідно з варіантами здійснення 18-32.

5 40. Дріжджова клітина згідно з варіантом здійснення 39, де експресійний конструкт тимчасово міститься в дріжджовій клітині.

41. Дріжджова клітина згідно з варіантом здійснення 39, де експресійний конструкт стабільно міститься в дріжджовій клітині.

10 42. Дріжджова клітина згідно з варіантами здійснення 39-41, де дріжджова клітина містить клітину штаму *Pichia pastoris*, клітину штаму *Pichia methanolica*, клітину штаму *Pichia angusta*, клітину штаму *Schizosaccharomyces pombe*, клітину штаму *Saccharomyces cerevisiae* або клітину штаму *Yarrowia lipolytica*.

43. Дріжджова клітина згідно з варіантами здійснення 39-41, де дріжджова клітина є клітиною штаму *Pichia pastoris*.

15 44. Спосіб продукування ентерокінази, що включає етап експресування ентерокінази з використанням дріжджової клітини згідно з варіантами здійснення 33-43.

45. Спосіб згідно з варіантом здійснення 44, де спосіб додатково включає очищення ентерокінази.

20 46. Спосіб розщеплення рекомбінантного поліпептиду, що включає етап контактування рекомбінантного поліпептиду, що містить сайт розщеплення SEQ ID № 1, з ентерокіназою, де ентерокіназа отримана способом згідно з варіантами здійснення 44 або 45, де контактування рекомбінантного поліпептиду з ентерокіназою призводить до специфічного розщеплення SEQ ID № 1.

25 47. Спосіб одержання рекомбінантного поліпептиду, що включає етап контактування рекомбінантного поліпептиду, що містить сайт розщеплення SEQ ID № 1, з ентерокіназою, де ентерокіназа отримана способом згідно з варіантами здійснення 44 або 45, де контактування рекомбінантного поліпептиду з ентерокіназою призводить до специфічного розщеплення SEQ ID № 1.

Приклади

30 Для повнішого розуміння репрезентативних варіантів винаходу, що розглядаються, не обмежуючи їх обсяг, надані наступні ілюстративні приклади. Ці приклади не повинні тлумачитись як такі, що обмежують винахід яким-небудь варіантом здійснення, розкритим у даному описі, що відносяться до способів експресії ЕК з використанням дріжджової експресійної системи, розкритої в даному описі.

35 Приклад 1

Синтез полінуклеотидної молекули, що кодує ЕК

40 Полінуклеотидна молекула SEQ ID NO: 4 синтезована з використанням стандартних хімічних процедур (BlueHeron Biotechnology, Bothell, WA). Наприклад, олігонуклеотиди довжиною від 20 до 50 основ синтезували, використовуючи стандартний фосфoramідитний синтез. Ці олігонуклеотиди гібридували в дволанцюжкові дуплекси, зв'язані разом у повнорозмірну полінуклеотидну молекулу. Цю полінуклеотидну молекулу клонували, використовуючи стандартні молекулярно-біологічні способи, у вектор pUCBHB1 біля сайту SmaI, щоб отримати pUCBHB1/EK. Синтезовану полінуклеотидну молекулу верифікували за допомогою секвенування, використовуючи Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) і секвенсер ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Подібну стратегію синтезу використовували для отримання полінуклеотидної молекули SEQ ID NO: 6, нуклеотидних варіантів SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, і усічених варіантів SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.

50 При необхідності, оптимізовану для експресії полінуклеотидну молекулу, що базується на SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, синтезують з метою поліпшення експресії в клітинах дріжджів. Полінуклеотидну молекулу, що кодує ЕК, модифікують для того, щоб вона: 1) містила синонімічні кодони, які типово присутні в полінуклеотидних молекулах природного походження бажаних штамів дріжджів; 2) містила долю G+C, ближче сумісну з середньою долею G+C у полінуклеотидних молекулах природного походження бажаних штамів дріжджів; 3) знижувала полімононуклеотидні ділянки, знайдені в межах полінуклеотидної молекули; та/або 55 4) елімінувала внутрішні регуляторні або конструкційні сайти, знайдені в межах полінуклеотидної молекули, дивись, наприклад, Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type E, міжнародну патентну заявку WO 2006/011966 (Feb. 2, 2006); Lance E. Steward et al., Optimizing Expression of Active Botulinum Toxin Type A, міжнародну патентну заявку WO 2006/017749 (Feb. 16, 2006), включені в даний опис у повному обсязі за 60

допомогою посилання. Як тільки завершиться оптимізація послідовності, синтезують олігонуклеотиди довжиною від 20 до 50 основ, використовуючи стандартний фосфoramідитний синтез. Ці олігонуклеотиди гібридизували в дволанцюжкові дуплекси, зв'язані разом у повнорозмірну полінуклеотидну молекулу. Цю полінуклеотидну молекулу клонували, використовуючи стандартні молекулярно-біологічні способи, у вектор pUCBHB1 біля сайту Smal, щоб отримати pUCBHB1/EK. Синтезовану полінуклеотидну молекулу верифікували за допомогою секвенування, використовуючи Big Dye Terminator™ Chemistry 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) і секвенсер ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Подібну стратегію синтезу використовували для отримання полінуклеотидної молекули, нуклеотидних варіантів SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, або усічених варіантів SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.

Приклад 2

Конструювання і експресування rPrT4Alpha/EK

Щоб сконструювати дріжджовий експресійний конструкт, який містить полінуклеотидну молекулу, що кодує EK, як описано в даній заявці, конструкт rJ201/rEK, що містить SEQ ID NO: 4, розщеплюють за допомогою XhoI і NotI, щоб відокремити вставку SEQ ID NO: 4. Отриманий рестрикційний фрагмент очищають за допомогою набору для гель-екстракції QIAQUICK® (QIAGEN, Inc., Valencia, CA), і фрагмент SEQ ID NO: 4 субклонують у вектор rPrT4Alpha_S (Ingenza, Ltd., Midlothian, UK), який був розщеплений рестрикційними ендонуклеазами XhoI і NotI. Вектор rPrT4Alpha_S включає сигнальну послідовність секреції фактору альфа, частину промотора AOX1 і послідовності завершення транскрипту AOD і AOX1, відкриту рамку читування ZEOCIN™. Фрагмент і вектор лігують, використовуючи протокол T4 ДНК лігази з отриманням rPrT4Alpha/rEK, аліквоту цієї лігаційної суміші трансформують за допомогою стандартного електропораційного протоколу в електрокомпетентні клітини NEB10 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). Трансформовані клітини поміщають у чашки Lennox з 1,5 % агаром Лурія-Бертані (pH 7,0), що містить 25 мкг/мл ZEOCIN™, і поміщають в інкубатор при 37 °C на всю ніч. Резистентні до ZEOCIN™ колонії відбирали як кандидатів для експресійних конструктів. Резистентні колонії вирощували, збирали і виділяли плазмідну ДНК, використовуючи стандартні способи, кандидати експресійних конструктів відбирали за допомогою рестрикційного розщеплення, використовуючи XhoI і NotI, XbaI, або NdeI для визначення присутності і орієнтації заданого інсерційного фрагменту. Культури, що містять бажаний експресійний конструкт rPrT4Alpha/rEK вирощували, збирали і виділяли плазмідну ДНК, використовуючи стандартні способи, і кандидати експресійних конструктів секвенували для визначення наявності заданого експресійного конструкта. Така стратегія клонування дає дріжджовий експресійний конструкт, що містить SEQ ID NO: 4. Подібну стратегію застосовували для отримання експресійного конструкта rPrT4Alpha/EK, що включає SEQ ID NO: 6, нуклеотидний варіант SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, або усічений варіант SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6. Альтернативно, полінуклеотидну молекулу SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, нуклеотидний варіант SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, усічений варіант SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6 синтезували, як описано в Прикладі 1.

Для конструювання дріжджових клітин, експресуючих ентерокиназу, яка кодується послідовністю SEQ ID NO: 4, молекула ДНК з експресійного конструкта rPrT4Alpha/rEK була ампліфікована в полімеразній ланцюговій реакції (PCR) з використанням прямого праймера AOX з послідовністю SEQ ID NO: 8 і зворотного праймера PUC з послідовністю SEQ ID NO: 9 для отримання касети лінійної інтеграції. Перші п'ять пар основ прямого праймера AOX містять сайт BglII, який не є ідентичним послідовності ДНК rPrT4Alpha/EK. Прямий праймер AOX зв'язується після ділянки, яка є частиною промотора AOX1. Не дивлячись на те, що повнорозмірний ген AOX1 не є присутнім у касеті лінійної інтеграції, весь повнорозмірний ген AOX1 реконструюється після інтеграції з хромосомою P. pastoris. Отриманий лінеаризований експресійний конструкт трансформують у відповідний штам CBS7435 P. pastoris MutS, використовуючи метод електропорації. Трансформаційну суміш поміщають в агарові чашки з 1,5 % дріжджів, пептону, декстрази і сорбітолу (YPDS) (pH 7,5), що містять 100 мкг/мл, 250 мкг/мл або 500 мкг/мл ZEOCIN™ і поміщають в інкубатор при 28-30 °C на 1-3 дні. Селекцію трансформантів, інтегруючих фрагмент rPrT4Alpha/EK у локуса 5' AOX1, визначають по колоніях, резистентних до ZEOCIN™. З різних чашок YPDS, що містять різні концентрації ZEOCIN™, і інокульованих у рідкому середовищі дріжджів, пептону, декстрази (YPD), що містить 100 мкг/мл ZEOCIN™, були відібрані шістьдесят дві колонії. Виділені дріжджові клітинні лінії вирощували, як і передбачалось, на рідкому середовищі YPD, що містить ZEOCIN™, визначаючи штами, що є резистентними до Zeocin і містять інтегровану касету rPrT4Alpha/EK. Аліквоти культур YPD, що містять виділені клітинні лінії дріжджів, поміщали в пробірки з 1 мл

рідкого середовища YPD, що містить 10 % (об./об.) гліцерола для культивування встановлених клітинних ліній, пробірки зберігали при -80°C. Подібну стратегію використовували для отримання дріжджових клітинних ліній, експресуючих ентерокиназу SEQ ID NO: 6, нуклеотидний варіант SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, або усічений варіант SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.

Для перевірки присутності інтегрованої касети rPrT4Alpha/E і визначення номера генної копії ЕК кожної виділеної дріжджової клітинної лінії був проведений аналіз PCR 62 виділених клітинних ліній. Один мілілітр був видалений зі згаданої вище культури YPD, його піддали лізису, виділили геномну ДНК, використовуючи стандартні процедури. Виділену геномну ДНК піддали PCR ампліфікації впродовж 29 циклів, використовуючи ентерокиназний прямий праймер SEQ ID NO: 10 і ентерокиназний зворотний праймер SEQ ID NO: 11 з метою продукування з гену ЕК продукту, що складається з 250 пар основ. Після завершення ампліфікації реакційну суміш перерозчиняли в 0,8 % агарозному гелі, що містить полінуклеотидну пляму поряд з леддером 2-log ДНК розміром 0,1-10 т.н. Ці експерименти підтверджують, що з 61 протестованої клітинної лінії був згенерований очікуваний фрагмент ЕК, що складається з 250 пар основ. PCR ампліфікацію повторювали, використовуючи ті ж геномні препарати ДНК, але проводячи лише 18 циклів, для визначення відносної копійності між штамми. Хоча спостерігався відносно низький рівень мінливості, чотири клітинні лінії показали підвищену геномну копійність порівняно з рештою.

Приклад 3

Аналіз ентерокиназної активності

Для того, щоб перевірити якісну і кількісну наявність експресованої ентерокинази, клітинні лінії, що містять інтегровану касету rPrT4Alpha/EK, були проаналізовані з використанням рідинно-колориметричного аналізу ентерокинази, SDS-PAGE, вестерн-блоттингу і ELISA. Для індукції експресії ентерокинази з інтегрованої касети rPrT4Alpha/EK аліквоту з кожної встановленої клітинної лінії інокулювали в струшувані колби на 100 мл, що містять по 10 мл ростового середовища, що включає 1,34 % (мас./об.) основи азотного агару (YNB), 200 мМ фосфатного буфера, 4×10^{-5} % (мас./об.) біотину і 1% (об./об.) гліцерола. Інокуляти вирощували при приблизно 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 обертів на хвилину) впродовж, приблизно, 60-65 годин. Клітини збирали центрифугуванням (3000 g при 22°C впродовж 5 хвилин). Для індукції ентерокиназної експресії клітинні пігулки ресуспендували в 1 мл середовища для первинної індукції, що містить 1,34 % (мас./об.) основи азотного агару (YNB), 200 мМ фосфатного буфера, 4×10^{-5} % (мас./об.) біотину і 5 % (об./об.) метанолу. Клітини культивували при приблизно 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.) впродовж приблизно 8-10 годин. Культури завантажували 100 мкл метанолу, культивували впродовж приблизно 16-18 годин і додавали додаткові 100 мкл метанолу до середовища кожні 24 години, фінальне завантаження метанолом відбулось через приблизно 72-74 години після індукції. Для порівняння даних, отриманих із зразків струшуваних колб, порівняльний тестовий штам B18 (експресійний конструкт rPrT4Alpha/EK-HIS штам CBS7435 *P. pastoris* MutS, який продукує His-тегову ентерокиназу) поміщали в дублікатні струшувані колби поряд з інтегрованими штамми.

Для визначення ферментативної активності експресованої ентерокинази зразки відбирали впродовж курсу розвитку культури і аналізували на наявність ентерокиназної активності, використовуючи рідинно-колориметричний аналіз. Тестову аліквоту середовища відбирали з дріжджових культур, описаних вище, через приблизно 0 годин, 24 години, 48 годин, 72 години і 96 годин після індукції. Тестові аліквоти додавали в пробірки і двічі центрифугували при 14000 об./хв. для видалення клітин. Аліквоту зразка отриманого середовища потім додавали в реакційну суміш, що містить 1 мМ колориметричного пептидного субстрату N-карбобензилокси-Lys-тіобензилового ефіра (Z-Lys-SBZL; Bachem, AG, Bubendorf, CH), у присутності 5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойна кислота) (DTNB). Реакція розщеплення ініціює знебарвлення жовтого забарвлення, а початкову швидкість вимірювали на планшеті-рідері кінетичним способом при оптичній щільності 405 нм. Концентрацію ензима доводили для забезпечення розведень зразків згідно з діапазоном лінійності способу (0-100 мОД/хв.). Зразки аналізували в трьох повторях з негативним і позитивним контролем.

Виходячи з результатів аналізу ентерокиназної активності всіх штамів, рідинно-колориметричний аналіз ентерокиназної активності був повторений з використанням чотирьох встановлених дріжджових клітинних ліній з найвищою ентерокиназною активністю, позначених як YCL-48, YCL-49, YCL-98 і YCL-99, і двох клітинних ліній з найнижчою ентерокиназною активністю, позначених як YCL-40 і YCL-88. Усі зразки аналізували в трьох повторях, використовуючи одноразові субстрати. На Фігурі X показана середня ентерокиназна активність кожної клітинної лінії залежно від часу пост-індукції. Величина помилки вказує 95% довірчий

інтервал між значеннями трьох повторів. Виходячи з отриманих даних, клітинна лінія YCL-49 мала найвищу ентерокіназну активність, а YCL-88 - найнижчу активність.

Для визначення ідентичності і якості експресованої ентерокінази у момент часу 96-98 годин після індукції, були взяті зразки YCL-40, YCL-48, YCL-49, YCL-88, YCL-98 і YCL-99 і проаналізовані з використанням SDS-PAGE і вестерн-блоттинга. Зразки додавали в 2x SDS буфер для зразків і розділяли за допомогою MOPS електрофорезу в поліакриламідному гелі, використовуючи 10-20 % Bis-Tris збірні поліакриламідні гелі (Expedeon, Inc, San Diego, CA) під впливом денатурування і відновлення. Для аналізу SDS-PAGE гелі підфарбовували Діамантовим Блакитним Кумассі, щоб виявити характер покресленості протеїнів. Для вестерн-блоттинга розділені поліпептиди переносили на нітроцелюлозу і просочували α -ентерокіназним антитілом. Ентерокіназний поліпептид був виразно видний на SDS-PAGE і вестерн-блоттах як одна смуга близько 38 кДа. Електрофоретична міграція показала, що ентерокіназа піддалась пост-трансляційної модифікації. Крім того, відсутність яких-небудь виявлених випадкових смуг показала високу якість ентерокінази, експресованої з дріжджових клітинних ліній з інтегрованою касетою rPrT4Alpha/EK.

Для визначення концентрації експресованої ентерокінази у момент часу 96-98 годин після індукції, були взяті YCL-49, YCL-88 і YCL-98 і проаналізовані з використанням твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). З тестових зразків були приготовані серії розведень і проаналізовані в трьох повторах разом з визначеними концентраціями комерційно доступного стандарту рекомбінантної ентерокінази (EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI). Калібрувальна крива, отримана для серії розведень комерційного стандарту, дозволила визначити кількісні характеристики зразків YCL-49 і YCL-88. Результати ELISA були використані для кількісного визначення рівня ентерокіназного продукту, присутнього в супернатанті зразків, отриманих після вирощування і експресії інтегрованих штамів (Таблиця 3).

Таблиця 3

Аналіз ELISA

Зразок	Концентрація ентерокінази
B18	1,0 мкг/мл
YCL-49	2,6 мкг/мл
YCL-88	2,9 мкг/мл
YCL-98	2,2 мкг/мл

Описані вище аналізи показали, що декілька встановлених дріжджових клітинних ліній експресували високоякісну, ферментативно активну ентерокіназу з інтегрованої касети rPrT4Alpha/EK.

Приклад 4

Конструювання і експресія rPICZ A/EK-мус-His

Для конструювання дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу, що кодує ЕК, відповідно до опису, сайти рестрикційної ендонуклеази, придатні для клонування функціонально зв'язаної нуклеїновокислої молекули у вектор rPIC A (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA), приєднують до 5'- і 3' кінців SEQ ID № 4, використовуючи стандартні процедури синтезу ДНК. Цей конструкт розщеплюють рестрикційними ензимами таким чином 1) відокремлюють SEQ ID № 4, що кодує ентерокіназу; і 2) адаптують цей інсерт для функціонального зв'язування з вектором rPIC A. Цей інсерт субклонують, використовуючи ДНК-лігазу T4, у вектор rPIC A, який розщеплюють за допомогою прийнятної рестрикційної ендонуклеази, отримуючи rPIC A/BoNT/E-мус-His. Лігаційну суміш трансформують у хімічний компонент клітин DH5b E. coli (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA), використовуючи метод теплового шоку, наносять на чашки з 1,5 % низькосольового агару Лурія-Бертані (pH 7,5), що містить 25 мкг/мл ZEOCIN™, і поміщають в інкубатор при 37°C на всю ніч. Бактерії, що містять експресійні конструкти, ідентифікують як колонії, резистентні до ZEOCIN™. Кандидати конструктів виділяють, використовуючи лужнолізисний спосіб мініпідготовки плазмід, і аналізують за допомогою рестрикційного картирування ендонуклеазного розщеплення для визначення присутності і орієнтації інсера. Ця стратегія клонування дає дріжджовий експресійний конструкт, що кодує ентерокіназу, функціонально зв'язаний із С-кінцевим с-мус, і полігістидиновими зв'язуючими пептидами. Подібну стратегію використовують для отримання експресійного конструкта rPIC A/EK, що включає SEQ ID № 6, нуклеотидний варіант SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6, або усічений варіант SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

Для конструювання дріжджової клітинної лінії, що експресує ентерокиназу, pPICZ A/EK-мус-His розщеплюють придатною рестрикційною ендонуклеазою (наприклад, SacI, PmeI або BstXI) і отриманий лінеаризований експресійний конструкт трансформують у прийнятний штам KM71H P. pastoris MutS, використовуючи спосіб електропорації. Трансформаційну суміш наносять на чашки з 1,5 % агаром YPDS (pH 7,5), що містить 100 мкг/мл ZEOCIN™, і поміщають в інкубатор при 28-30°C на 1-3 дні. Відбирають трансформанти, інтегруючи pPICZ A/EK-мус-His на 5'-кінці локуса AOX1, по колоніях, резистентних до ZEOCIN™. Клітинні лінії, що інтегрують конструкт pPICZ A/EK-мус-His, потім тестують на наявність ентерокиназної експресії. Виділені колонії тестових клітинних ліній, що мають інтегровані pPICZ A/EK-мус-His, використовують для інокуляції колб з перегородками, об'ємом 1,0 л, що містять 100 мл середовища MGYH, і вирощують при, приблизно, 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.) до того часу, поки культура не досягає OD600=2-6 (у середньому 16-18 годин). Клітини збирають центрифугуванням (3000x g при 22°C протягом 5 хвилин). Для індукції експресії клітинні пігулки ресуспендують у 15 мл середовища MMH і додають 100 % метанолу до кінцевої концентрації 0,5 %. Культури вирощують при приблизно 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.) упродовж шести днів. Додатковий 100 % метанол додають до культури кожні 24 години до кінцевої концентрації 0,5 %. Тестову аліквоту в 1,0 мл відбирають з культури кожні 24 години, починаючи з часу нуль і закінчуючи 144 годинами. За допомогою мікроцентрифугування з аліквот збирають клітини, потім клітинні пігулки піддають лізису, використовуючи триразове заморожування-відтаювання в режимі 5 хвилин при -80 °C, а потім 5 хвилин при 37 °C. Лізисні зразки додають у 2x SDS буфер для зразків (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) і вимірюють експресію зі встановлених клітинних ліній з використанням SDS-PAGE і вестерн-блоттинга (як описано в Прикладі 3). Клітинну лінію KM71H P. pastoris MutS, що демонструє підвищений рівень експресії ентерокинази, відбирають для великомасштабної експресії з використанням комерційних ферментативних процедур. Процедури для великомасштабної експресії є такими, як вказано вище, за винятком того, що об'єм культури складає 2,5 л ростового середовища MGYH у ферментері BioFlo 3000, об'ємом 5 л, і концентрації всіх реагентів підвищують пропорційно цьому об'єму. Для детальнішого ознайомлення з процедурами, описаними в даному прикладі, дивись EasySelect™ Pichia Expression Kit, version G, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ6 in Pichia pastoris, 122701, 25-0172 (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA). Подібну стратегію використовують для отримання клітинної лінії, що експресує ентерокиназу з SEQ ID № 6, нуклеотидний варіант з SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6, або усичений варіант з SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

Приклад 5

Конструювання і експресія pMET/EK-V5-His

Для конструювання дріжджового експресійного конструкту, що містить полінуклеотидну молекулу, що кодує EK, відповідно до даного опису, сайти рестрикційної ендонуклеази, придатні для клонування функціонально зв'язаної нуклеїновокислої молекули у вектор pMET (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) приєднують до 5'- і 3'-кінців SEQ ID № 4, використовуючи стандартні процедури синтезу ДНК. Цей конструкт розщеплюють рестрикційними ензимами наступним чином 1) відокремлюють SEQ ID № 4, що кодує ентерокиназу; і 2) адаптують цей інсерт для функціонального зв'язування з вектором pMET. Цей інсерт субклонують, використовуючи ДНК-лігазу T4, у вектор pMET, який розщеплюють за допомогою прийнятої рестрикційної ендонуклеази, отримуючи pMET/BoNT/E-V5-His (Фіг. 9). Лігаційну суміш трансформують у хімічний компонент клітин DH5α E. coli (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA), використовуючи метод теплового шоку, наносять на чашки з 1,5 % низькосольового агару Лурія-Бертані (pH 7,5), що містить 100 мкг/мл ампіциліну, і поміщають в інкубатор при 37°C на всю ніч. Бактерії, що містять експресійні конструкти, ідентифікують як колонії, резистентні до ампіциліну. Кандидати конструктів виділяють, використовуючи лужнолізисний спосіб мініпідготовки плазмід, і аналізують за допомогою рестрикційного картирування ендонуклеазного розщеплення для визначення присутності і орієнтації інсрта. Ця стратегія клонування дає дріжджовий експресійний конструкт, що кодує ентерокиназу, функціонально пов'язаний із C-кінцевим V5, і поліглістидиновими зв'язуючими пептидами. Подібну стратегію використовують для отримання експресійного конструкту pMET/EK, що включає SEQ ID № 6, нуклеотидний варіант SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6, або усичений варіант SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

Для конструювання дріжджової клітинної лінії, що експресує ентерокиназу, pMET/BoNT/E-V5-His розщеплюють придатною рестрикційною ендонуклеазою (наприклад, ApaI, AscI, FseI, PacI, KpnI або PstI), і отриманий лінеаризований експресійний конструкт трансформують у прийнятний штам PMAD16 P. methanolica MutS, використовуючи спосіб електропорації. Трансформаційну суміш наносять на чашки з 1,5 % агаром MD (pH 7,5), позбавленим аденіну, і

поміщають в інкубатор при 28-30°C на 3-4 дні. Селекцію трансформантів, інтегруючих pMET/EK-V5-His, визначають по колоніях, зростаючих на аденін-дефіцитному середовищі. Ade+ клітинні лінії, інтегруючі конструкт pMET/EK-V5-His, тестують на наявність ентерокиназної експресії, використовуючи дрібномасштабний експресійний тест. Виділені Ade+ колонії з тестових клітинних ліній, що мають інтегрований pMET/EK-V5-His, використовують для інокуляції 15 мл середовища BMDY і вирощують при приблизно, 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.), поки культура не досягне OD600=2-10 (у середньому 16-18 годин). Клітини збирають центрифугуванням (1500 x g при 22°C упродовж 5 хвилин). Для індукування експресії клітинні пігулки ресуспендують у 5 мл середовища BMMY і культури вирощують при, приблизно, 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.). Через 24 години відбирають аліквоту 500 мкл, і додають метанол до кінцевої концентрації 0,5 %, і культуру вирощують при, приблизно, 28-30 °C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.). Відбирають 500 мкл аліквоту, і до культури додають додатковий метанол до кінцевої концентрації 0,5 % кожні 24 години впродовж 3-5 днів. Зібрані клітини центрифугують (1500x g при 4°C упродовж 5 хвилин), один раз промивають водою, і зберігають клітинні пігулки при -80°C, поки не знадобляться. Для визначення експресії індукованої ентерокинази клітинні пігулки, відібрані в кожен момент часу, піддають лізису, використовуючи оброблені кислотою скляні кульки. Лізисні зразки додають до 2x SDS буфера для зразків (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA), а експресію зі встановлених клітинних ліній вимірюють за допомогою SDS-PAGE і вестерн-блоттинга (як описано в Прикладі 3). Клітинну лінію PMAD16 *P. methanolica* MutS, що демонструє підвищений рівень експресії ентерокинази, відбирають для великомасштабної експресії з використанням комерційних ферментативних процедур. Процедури для великомасштабної експресії є такими, як вказано вище, за винятком того, що об'єм культури складає 2,5 л ростового середовища BMDY/BMMY у ферментері BioFlo 3000, об'ємом 5 л, і концентрації всіх реагентів підвищують пропорційно цьому об'єму. Для детальнішого ознайомлення з процедурами, описаними в даному прикладі, дивись *P. methanolica* Expression Kit, version C, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia methanolica*, 062101, 25-0288 (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA). Подібну стратегію використовували для отримання клітинної лінії, що експресує ентерокиназу з SEQ ID № 6, нуклеотидний варіант з SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6, або усічений варіант з SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

Приклад 6

Конструювання і експресія pYES2/EK-V5-His

Для конструювання дріжджового експресійного конструкта, що містить полінуклеотидну молекулу, що кодує EK, відповідно до даного опису, сайти рестрикційної ендонуклеази, придатні для клонування функціонально зв'язаної нуклеїновокислої молекули у вектор pYES2 (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) приєднують до 5'- і 3'- кінців SEQ ID № 4, використовуючи стандартні процедури синтезу ДНК. Цей конструкт розщеплюють рестрикційними ензимами наступним чином 1) відокремлюють SEQ ID № 4, що кодує ентерокиназу; і 2) адаптують цей інсерт для функціонального зв'язування з вектором pYES2. Цей інсерт субклонують, використовуючи ДНК-лігазу T4, у вектор pYES2, який розщеплюють за допомогою прийнятної рестрикційної ендонуклеази, отримуючи pYES2/EK-V5-His (ФІГ. 10). Лігаційну суміш трансформують у хімічно компетентні клітини DH5α *E. coli* (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA), використовуючи метод теплового шоку, наносять на чашки з 1,5 % низкосольового агару Лурія-Бертані (pH 7,5), що містить 100 мкг/мл ампіциліну, і поміщають в інкубатор при 37°C на всю ніч. Бактерії, що містять експресійні конструкти, ідентифікують як колонії, резистентні до ампіциліну. Кандидати конструктів виділяють, використовуючи лужнолізисний спосіб мініпідготовки плазмід, і аналізують за допомогою рестрикційного картирування ендонуклеазного розщеплення для визначення присутності і орієнтації інсерта. Ця стратегія клонування дає дріжджовий експресійний конструкт, що кодує ентерокиназу, функціонально пов'язаний із С-кінцевим V5, і полігістидиновими зв'язуючими пептидами. Подібну стратегію використовують для отримання експресійного конструкта pYES2/EK, що включає SEQ ID № 6, нуклеотидний варіант SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6, або усічений варіант SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

Для конструювання дріжджової клітинної лінії, що експресує ентерокиназу, pYES2/EK-V5-His трансформують у компетентний штам INVSc1 *S. Cerevisiae*, використовуючи заснований на літії трансформаційний спосіб. Трансформаційну суміш наносять на чашки з 2 % мінімальним агаровим середовищем SC (pH 7,5), що містить 2 % глюкози, які або містять 0,01 % урацилу, або не мають урацилу, поміщають при 28-30°C в інкубатор на 1-3 дні. Селекцію трансформантів, що містять pYES2/EK-V5-His, визначають лише по колоніях, зростаючих на чашках з урацилом. Клітини, що містять конструкт pYES2/EK-V5-His, тестують з приводу ентерокиназної експресії, використовуючи дрібномасштабний аналіз експресії. Виділені колонії з

тестових клітин, що містять pYES2/EK-V5-His, використовували для інокулювання пробірок на 50 мл, що містять 15 мл середовища SC, що містить 2 % глюкози і 0,01 % урацилу, і вирощували всю ніч при приблизно 28-30°C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв). Визначали OD600 культури і відбирали аліквоти для отримання клітинної концентрації 0,4 OD600 в об'ємі 50 мл, ці аліквоти центрифугували (1500x g при 22°C впродовж 5 хвилин), і отримані клітинні пігулки ресуспендували в середовищі SC, що містить 20 % галактози і 10 % раффінози. Клітини вирощували при приблизно 28-30 °C у шейкерному інкубаторі (250 об./хв.), аліквоти об'ємом 5 мл відбирали через 0 годин, 4 години, 8 годин, 12 годин, 16 годин і 24 години, для кожного зразка визначали концентрацію OD600. Зібрані клітини центрифугували (1500x g при 4°C впродовж 5 хвилин), один раз промивали водою, а клітинні пігулки зберігали при -80°C поки не знадобляться. Для визначення експресії індукованого BoNT/E-V5-His клітинні пігулки, відібрані в кожен момент часу, піддавали лізису, використовуючи оброблені кислотою скляні кульки. Лізисні зразки додавали до 2x SDS буфера для зразків (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA), а експресію зі встановлених клітинних ліній вимірювали за допомогою SDS-PAGE і вестерн-блоттинга (як описано в Прикладі 3). Індукційні умови, що призводять до підвищення рівнів експресії ентерокинази, відбирали для великомасштабної експресії з використанням комерційних ферментативних процедур. Процедури для великомасштабної експресії є такими, як вказано вище, за винятком того, що об'єм культури складає 2,5 л ростового середовища BMDY/BMMY у ферментері BioFlo 3000, об'ємом 5 л, і концентрації всіх реагентів підвищують пропорційно цьому об'єму. Для детальнішого ознайомлення з процедурами, описаними в даному прикладі, дивись pYES2/CT, pYES3/CT, і pYC2/CT Yeast Expression Constructs with C-terminal Tags and Auxotrophic Selection Markers, version E, 25-0304, Jan. 27, 2003 (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA). Подібну стратегію використовували для отримання клітинної лінії, що експресує ентерокиназу з SEQ ID № 6, нуклеотидний варіант з SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6, або усічений варіант з SEQ ID № 4 або SEQ ID № 6.

На закінчення, слід розуміти, що хоча варіанти здійснення винаходу даної заявки описані шляхом посилання на специфічні варіанти здійснення винаходу, фахівець у даній області техніки легко визначить, що ці розкриті варіанти здійснення винаходу є ілюстративними і аж ніяк не повинні розглядатись як такі, що обмежують обсяг домагань конкретними методологіями, протоколами та/або реагентами і тому подібним, розкритими в даному описі. По суті, різні модифікації, або зміни, або альтернативні конфігурації об'єктів винаходу можуть бути здійснені відповідно до ідеї патенту в межах обсягу винаходу. І, нарешті, термінологія даного опису застосована лише для опису окремих випадків здійснення винаходу, і не призначена обмежувати обсяг даного винаходу, визначений виключно формулою винаходу. Отже, даний винахід не обмежується конкретно показаним і описаним тут.

У даній заявці описані певні варіанти здійснення даного винаходу, у тому числі найкращий з відомих авторам варіант здійснення даного винаходу. Безумовно, для середнього спеціаліста в даній області техніки очевидними будуть варіації цих описаних втілень, виходячи з вищевикладеного опису. Автори винаходу очікують, що спеціалісти використовуватимуть такі варіації відповідним чином, і автори даного винаходу передбачають здійснення даного винаходу іншим чином, що є відмінним від конкретно описаного тут. Відповідно, цей винахід включає всі модифікації і еквіваленти об'єкту, викладеного у формулі винаходу, що додається, як передбачено діючим законодавством. Крім того, винахід охоплює будь-які комбінації вищеповисаних втілень у всіх можливих їх варіаціях, якщо тут не вказане інше або це явним чином не протирічить контексту винаходу.

Групи альтернативних втілень, елементів або етапів даного винаходу не повинні аналізуватись як обмеження. Представник кожної групи може розглядатись або заявлятися у формулі індивідуально або в будь-якій комбінації з представниками інших груп, описаних у даній заявці. Очікується, що один або більше представників групи можуть бути включені або видалені з неї для зручності та/або з метою забезпечення патентоспроможності. Коли будь-яке таке включення або виключення відбувається, то вважається, що опис винаходу містить групу із змінами, отже, таку, що задовольняє письмовий опис усіх груп Маркуша, використаних у доданій формулі.

Якщо не вказане інше, то всі числа, що виражають характеристики, елемент, кількість, параметр, властивість, термін, і так далі, що використовуються в даному описі і формулі винаходу, слід розуміти як модифіковані у всіх випадках терміном «приблизно». Відповідно до даного опису, термін «приблизно» означає, що характеристика, елемент, кількість, параметр, властивість або термін охоплюють діапазон плюс або мінус десять відсотків вище і нижче значення заявленої характеристики, елементу, кількості, параметра, властивості або терміну. Відповідно, якщо не вказане протилежне, то числові параметри, сформульовані в описі і

прикладеній формулі є приблизними, так що вони можуть змінюватись. Як мінімум, і не як спроба обмежити використання теорії еквівалентів в обсязі формули, кожне числове вказування потрібно, як мінімум, тлумачити з урахуванням повідомлених значущих цифр і звичайних способів округлення. Не дивлячись на це, числові діапазони і значення, що формулюють

5 широкий обсяг винаходу, є апроксимаціями, числові діапазони і значення, вказані в специфічних прикладах, відображаються якомога точніше. Проте, будь-який числовий діапазон або значення невід'ємно містить певні помилки, що неминуче виникають унаслідок погрешностей, знайдених у відповідних дослідних вимірах. Перерахування тут числових діапазонів значень призначене тільки для того, щоб слугувати як умовне позначення індивідуального посилання на кожне

10 окреме числове значення, що потрапляє у вказаний діапазон. Якщо тут не вказане інше, то кожне індивідуальне значення числового діапазону включене в даний опис, як якщо б воно було перераховане тут індивідуально.

Застосування слів в однині та множині і аналогічних позначень у контексті опису даного винаходу (особливо у контексті наступної формули винаходу) слід тлумачити як таке, що охоплює як однину, так і множину, якщо тільки тут не вказане інше або якщо це явно не протирічить контексту. Всі описані тут способи можуть виконуватись у будь-якому прийнятному порядку, якщо не вказане інше або це явним чином не протирічить контексту винаходу. Використання будь-якого і всіх прикладів або зразкових формулювань (наприклад, "такий як"), запропонованих у даному описі, призначене для чіткішого роз'яснення даного винаходу і не

20 накладає обмежень на обсяг винаходу, якщо тільки не заявлене інше. У даному описі відсутнє формулювання, яке слід тлумачити як таке, що позначає будь-який незаявлений елемент, як істотний для застосування винаходу на практиці.

Специфічні варіанти здійснення винаходу, розкриті в даному описі, можуть бути ще обмежені у формулі використанням фрази «що складається з» або «що складається головним чином з». При використанні у формулі перехідного терміну «що складається з» виключаються

25 будь-які елементи, етапи або інгредієнти, не визначені формулою винаходи. Перехідний термін "складається головним чином з" обмежує обсяг формули специфічними матеріалами або етапами, які не зачіпають основні і нові характеристики. Заявлені варіанти здійснення винаходу свідомо або визначено описані і розкриті в даному описі.

Всі патенти, патентні публікації і інші публікації, на які посилаються в даному описі та які ідентифіковані цим описом, окремо і явним чином повністю включені в даний документ за допомогою посилань з метою опису та розкриття, наприклад, композицій і методологій, описаних у таких публікаціях, які можуть бути використані стосовно даного винаходу. Ці публікації викладені лише для їх розкриття до дати подання даної заявки. Ніщо в зв'язку з цим

35 не повинне тлумачитись як підтвердження того, що авторам винаходу не надано право датувати заднім числом таке розкриття перевагами попереднього винаходу або на інших основах. Усі твердження відносно дати або репрезентація відносно змісту цих документів засновані на інформації, що знаходиться у розпорядженні заявників, і не дозволяють будь-яке припущення відносно коректності дат або змісту цих документів.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Ізольована полінуклеотидна молекула, що кодує ентерокиназу, що містить SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.

2. Ізольована полінуклеотидна молекула за п. 1, яка **відрізняється** тим, що нуклеїновокисла молекула додатково містить дріжджовий експресійний конструкт.

3. Дріжджовий експресійний конструкт, що містить дріжджовий вектор експресії, функціонально пов'язаний з полінуклеотидом, що містить SEQ ID NO: 4.

4. Дріжджовий експресійний конструкт за п. 3, який **відрізняється** тим, що додатково містить полінуклеотидну послідовність, що кодує фактор альфа, функціонально пов'язану з полінуклеотидом, що містить SEQ ID NO: 4.

5. Дріжджовий експресійний конструкт за п. 4, який **відрізняється** тим, що полінуклеотидною послідовністю, що кодує фактор альфа, функціонально пов'язаною з полінуклеотидом, що містить SEQ ID NO: 4, є SEQ ID NO: 6.

6. Дріжджова клітина, що містить дріжджовий експресійний конструкт, що містить SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.

7. Дріжджова клітина за п. 6, яка **відрізняється** тим, що дріжджовий експресійний конструкт міститься в дріжджовій клітині тимчасово.

8. Дріжджова клітина за п. 6, яка **відрізняється** тим, що дріжджовий експресійний конструкт міститься в дріжджовій клітині постійно.

9. Дріжджова клітина за п. 6, яка **відрізняється** тим, що містить клітину штаму *Pichia pastoris*, клітину штаму *Pichia methanolica*, клітину штаму *Pichia angusta*, клітину штаму *Schizosaccharomyces pombe*, клітину штаму *Saccharomyces cerevisiae* або клітину штаму *Yarrowia lipolytica*.
- 5 10. Дріжджова клітина за п. 6, яка **відрізняється** тим, що є клітиною штаму *Pichia pastoris*.
11. Спосіб продукування ентерокінази, що включає етап експресії в дріжджовій клітині дріжджового експресійного конструкту, що містить SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.
12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що дріжджова клітина містить клітину штаму *Pichia pastoris*, клітину штаму *Pichia methanolica*, клітину штаму *Pichia angusta*, клітину штаму
- 10 *Schizosaccharomyces pombe*, клітину штаму *Saccharomyces cerevisiae* або клітину штаму *Yarrowia lipolytica*.
13. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що дріжджова клітина є клітиною штаму *Pichia pastoris*.
14. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що спосіб додатково включає очищення
- 15 ентерокінази, що кодується SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6.
15. Спосіб розщеплення рекомбінантного поліпептиду, що включає етап контактування поліпептиду, що містить сайт розщеплення SEQ ID NO: 1, з ентерокіназою, а ентерокіназа продукується шляхом експресії в дріжджовій клітині дріжджового експресійного конструкту, що містить SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 6, де контактування поліпептиду з ентерокіназою
- 20 призводить до специфічного розщеплення SEQ ID NO: 1.

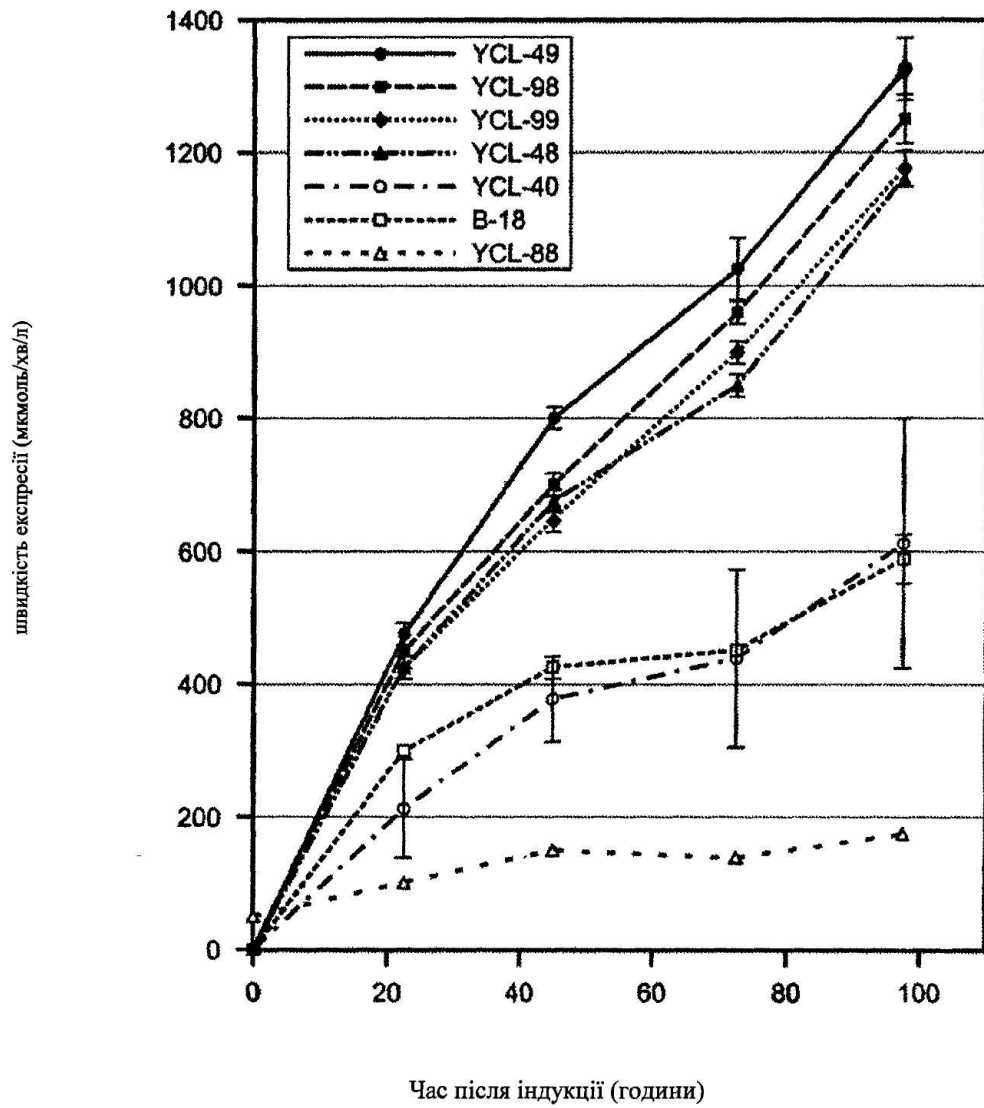


Fig. 1

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601