

D

ELJÁRÁS SEJTTENYÉSZTÉSRE**KIVONAT**

A találmány rekombináns terápiás glikoproteineknek, például humán eritropoetinnek (erythropoietin, Epo), rekombináns sejtvonalak alkalmazásával végzett, gazdaságos előállítási eljárására vonatkozik, amelynek során

- (a) előállítanak egy transzformált eukarióta gazdasejtet, amely egy olyan nukleotid-szekvenciát tartalmaz, amely kódolja az adott rekombináns polipeptidet, és amely irányítja az adott rekombináns polipeptid expresszióját a gazdasejtben;
- (b) előállítanak egy olyan, szérummentes tápfolyadékot, amely
 - (i) a következő komponenseket tartalmazza: víz, egy növényi eredetű pepton, egy ozmolaritás regulátor, egy puffer, egy energiaforrás, aminosavak, egy lipidforrás vagy lipid-prekurzor, egy vasforrás, vastól eltérő fémionok, valamint egy vagy több vitamin és ko-faktor, és (ii) nem tartalmaz semmilyen teljes hosszúságú polipeptidet; és
- (c) a transzformált eukarióta sejtet a tápfolyadékban olyan körülmények között tenyésztik, amelyek lehetővé teszik az adott rekombináns polipeptid expresszióját.

H

2000 01 27



P0402219

ELJÁRÁS SEJT TENYÉSZTÉSRE

A találmány tárgya eljárás rekombináns terápiás glikoproteineknek, például humán eritropoetinnek (erythropoietin, Epo), rekombináns sejtvonalak alkalmazásával végzett gazdaságos előállítására.

Az eritropoetin (Epo) az eritroid progenitor sejtek proliferációját és differenciálódását, valamint a keringésben a vörsvérsejtek fiziológiás szintjeinek a fenntartását szabályozó legfontosabb hormon. A magzatban az Epo mindenekelőtt a májban termelődik, majd a születés után az Epo képződésének a körülbelül 90 %-a áthelyeződik a vesébe. Ha az Epo mennyisége krónikus vagy akut veseelégtelenség miatt, például rákos betegekben, lecsökken, az anaemia kialakulásának a megelőzése érdekében az Epo-t kívülről kell bejuttatni a szervezetbe. Az Epo génnek és a rágcsáló sejtekben történő expresszállásának a felismerése óta már hozzáférhető egy terápiásan aktív humán eritropoetin.

A humán Epo gén egy 27 aminosavból álló szignál peptidet és egy 166 aminosavból álló, 18 399 Dalton számított molekulasúlyú proteint kódol. Az érett proteinnek általában egyetlen N-terminális aminosav-deleciója van, és 165 aminosav hosszúságú. A szignál szekvencia a peptidet a megfelelő glikozilezésben részt vevő sejtrészekhez irányítja, amelynek eredményeként egy három N- és egy O-glikozilezési hellyel rendelkező érett protein képződik. A cukorrész, ami a teljes molekulatömeg körülbelül 40 %-át teszi ki, az Epo teljes biológiai akti-

vitása szempontjából esszenciális fontosságú. Számos vizsgálat kimutatta, hogy a terminális szialinsavcsoportok száma pozitív hatást gyakorol az *in vivo* felezési időre, viszont az *in vitro* aktivitás, azaz a receptorhoz történő kötődés, a nem vagy részlegesen glikozilezett formában a legnagyobb [Takeuchi and Kobata, GLYCOBIOLOGY, 1 (4), 337-346 (1991)]. A szialilezés foka egyenesen arányos a felezési idővel, ahol a kevesebb szialinsavval rendelkező izoformák sokkal gyorsabban kiürülnek a szervezetből, ezért kisebb aktivitást mutatnak.

A terapeutikumokként alkalmazott polipeptidek, például az Epo előállítására irányuló gazdaságos, ipari méretű fermentációs eljárásoknak a következő követelményeknek kell eleget tenniük:

- (1) a sejttenyésztés tápfolyadék (vagy másként: médiuma vagy közege) nem tartalmazhat költséges vegyületeket, például szérum- vagy rekombináns proteineket;
- (2) az esetleges prion-szennyeződés miatt a tápfolyadék semmiféle állati eredetű komponenst nem tartalmazhat;
- (3) az eljárásnak nagyobb méretekben is végrehajthatónak (scaleable) kell lennie, és nagy végső koncentrációban kell az adott rekombináns proteint eredményeznie;
- (4) a felülúszónak nagy mennyiségben kell tartalmaznia a nagy *in vivo* aktivitást mutató Epo molekulákat, azaz a kisebb *in vivo* aktivitású izoformák általi veszteséget a tisztítás során csökkenteni kell.

Az 5 441 868. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 28-29. oldalán lévő 10. példában egy három-négy

lépésből álló fermentációs eljárást ismertetnek. Egy első lépésben a sejteket egy 850 cm²-es forgó edényben (roller bottle) 200 ml olyan tápfolyadékra oltják, amely egy 5 % magzati borjúszérumot tartalmazó, 50:50 arányú DMEM/Hams F12 keverékből áll. Három nappal később, amikor a sejtek növekedése elérte a konfluenciát, a médiumot eltávolítják, és egy olyan 50:50 arányú DMEM/Hams F12 keverékből álló tápfolyadékkal helyettesítik, amely nem tartalmaz magzati borjúszérumot. Az edényeket 1-3 órás időtartamra visszahelyezik az inkubátorba, majd a tápfolyadékot ismét eltávolítják és 100 ml szérummentes médiummal helyettesítik. Ezt a lépést a szennyező szérumproteinek koncentrációjának a csökkentésére alkalmazzák. Ezt követően a forgó edényeket hét napra visszahelyezik az inkubátorba. Az egy hét elteltével a médiumot kinyerik és egy második termelési ciklushoz 100 ml szérummentes tápfolyadékkal helyettesítik. Ennek a termelési rendszernek az egyik gyakorlati megvalósítása során például egy reprezentatív hétnapos médium minta aktivitása körülbelül $3,892 \pm 409$ E/ml, ami (130 000 E/mg becsült fajlagos aktivitásnál) 30 mg/liter koncentrációnak felel meg.

Ez a költséges szérumtartalmú médium alkalmazásával végzett eljárás a felülszóban 30 µg/ml végső Epo koncentrációt eredményez. Annak ellenére, hogy a szérum szigorúan ellenőrzött, nem lehet teljesen kizárni a fertőzőanyagokkal és scPrionokkal történő szennyeződést [legvalószínűbben az scPrionok felelősek a Creutzfeldt-Jakob betegségnek (Creutzfeldt-Jakob Disease, CDJ) az emberekre történő átviteléért].



Az 5 688 679. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 5. példájában egy olyan rekombináns sejtvonal előállítását ismertetik, amely (78 000 - 130 000 E/mg becsült fajlagos aktivitásnál) 40-80 mg/liter végső Epo koncentrációt eredményez. Egyéb állati eredetű komponensek mellett a tenyésztő médium 20 % magzati borjúsérumot és 1 bovin-sérumalbumint tartalmaz. Az ilyen tápfolyadékok esetén ugyanazok a prionokkal és fertőzőanyagokkal kapcsolatos problémák merülnek fel, mint amelyeket a fentiekben említettünk.

A WO 96/35718. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés egy olyan eljárást ismertet eritropoetin előállítására, amely eljárás állati eredetű komponensektől teljesen mentes. A tápfolyadék azonban költséges funkcionális rekombináns proteineket, például inzulint és transzferrint tartalmaz.

A WO 99/28346. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés az eritropoetin előállítására egy csökkentett (1 %) szérumtartalmú, illetve szérummentes médium alkalmazásával végzett fermentációs eljárást ismertet. A leírás szerint legalább 30-50 mg/liter végső Epo koncentrációt értek el. A tápfolyadék azonban még mindig tartalmaz költséges funkcionális rekombináns proteineket, amilyen például az inzulin és a transzferrin.

Lee és mások egy statisztikai tervezés alkalmazásával rekombináns humán eritropoetint termelő CHO sejtvonal esetén alkalmazható tenyésztőközeg kifejlesztésére ismertetnek eljárást [Lee et al., J. BIOTECHNOL., 69, 85-93 (1999)]. Ezzel a megoldással 25 µg/ml végső Epo koncentrációt értek el. A tápfolyadék

azonban még mindig tartalmaz költséges és nemkívánatos állati eredetű termékeket és funkcionális rekombináns proteineket, amilyen például az inzulin.

Szükség van tehát olyan, rekombináns proteinek előállítására alkalmas tápfolyadékok és körülmények kifejlesztésére, amelyek nem tartalmaznak költséges és nemkívánatos állati eredetű termékeket és funkcionális rekombináns proteineket, például inzulint.

A jelen találmány egy olyan, új fermentációs protokollt biztosít, amelyben egy szérumot vagy más funkcionális (és/vagy rekombináns) teljes hosszúságú proteineket nem tartalmazó, gazdaságos tápfolyadékot alkalmazunk. Ezenkívül számos olyan paramétert azonosítottunk, amelyet mind a kihozatal, mind pedig (a nagyobb mértékű szialilezésnek köszönhetően) az aktivitás vonatkozásába felhasználhatunk a protein expresszió optimalizálására, például sejtek metotrexát (methotrexate) nélküli tenyésztésére. Az említett optimalizált paraméterek alkalmazásával lehetőség nyílik akár 600 mg/liter vagy még nagyobb végső proteinkoncentráció elérésére, ahol a rekombináns termék (Epo) nagymértékben szialilizett.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezi egy eljárás egy adott rekombináns polipeptid előállítására, amelynek során

- (a) előállítunk egy transzformált eukarióta gazdasejtet, amely egy olyan nukleotid-szekvenciát tartalmaz, amely kódolja az adott rekombináns polipeptidet, és amely irányítja az adott rekombináns polipeptid expresszióját a gazdasejtben;
- (b) előállítunk egy olyan, szérummentes tápfolyadékot, amely

- (i) a következő komponenseket tartalmazza: víz, egy növényi eredetű pepton, egy ozmolaritás regulátor, egy puffer, egy energiaforrás, aminosavak, egy lipidforrás vagy lipidprekurzor, egy vasforrás, vastól eltérő fémionok, valamint egy vagy több vitamin és ko-faktor, és (ii) nem tartalmaz semmilyen teljes hosszúságú polipeptidet; és
- (c) a transzformált eukarióta sejtet a tápfolyadékban olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek lehetővé teszik az adott rekombináns polipeptid expresszióját.

A tápfolyadék előnyösen nem tartalmaz semmilyen állati eredetű komponenst. Ennek megfelelően az egyik előnyös találmány szerinti megoldás egy olyan tápfolyadékra vonatkozik, amely állati eredetű komponensektől tökéletesen mentes.

Előnyösen az adott rekombináns polipeptid humán eritropoetin. A gazdasejt például egy CHO (Chinese hamster ovary) sejt lehet.

Az egyik előnyös megoldásban az adott rekombináns polipeptidet, előnyösen humán eritropoetint kódoló nukleotid-szekvenciát a gazdasejt genomjába integráljuk, és operábilisen egy dihidrofolát-reduktázt kódoló nukleotid-szekvenciához kötjük, és a gazdasejtet metotrexát nélkül tenyésztjük. Előnyösen a gazdasejt egy CHO sejt.

A rekombináns protein termelt mennyiségének a javítására a következő paraméterek közül egyet vagy többet alkalmazhatunk:

- (1) Az energiaforrás előnyösen glükóz. Egy előnyös megoldásban a tápfolyadék kezdetben legalább 5 g/liter glükózt tartalmaz, és a koncentrációt a (c) tenyésztési lépés ideje

alatt 3 g/liter érték felett tartjuk.

- (2) A tápfolyadék előnyösen foszfátot, például legalább 0,2, 0,4 vagy 0,6 g/liter foszfátot tartalmaz. Az egyik előnyös találmány szerinti megoldásban a tápfolyadék 0,3 g/liter-nél több foszfátot tartalmaz, különösen ahol az energiaforrás glükóz.
- (3) A tápfolyadék pH-ja kezdetben körülbelül 7,1, és a (c) tenyésztési lépés ideje alatt körülbelül 6,9-re csökken. Előnyösen a csökkenés legalább egynapos időtartam alatt játszódik le.
- (4) A tápfolyadék nyomelemeket és egy, két vagy több vitamint is tartalmaz. Egy ilyen tápfolyadék egyik előnyös megoldásában az energiaforrás előnyösen glükóz. Az ilyen tápfolyadék előnyösen 0,3 g/liternél több foszfátot tartalmaz.
- (5) A tápfolyadékot a (c) tenyésztési lépés ideje alatt előnyösen egy vagy több aminosavat és egy növényi eredetű peptont tartalmazó, dúsított tápanyaggal tápláljuk. ezenkívül legalább egy szénhidrát is jelen lehet.

Az előbbi paraméterek közül kettőt vagy többet egymással kombinálva is alkalmazhatunk.

A találmány szerinti eljárás jellemzően magában foglal továbbá egy olyan (d) lépést is, amelynek során az adott rekombináns polipeptidet kinyerjük a tenyészetből. Ahol az adott rekombináns polipeptid, például az eritropoetin a tápfolyadékba szekretálódik, ott a polipeptidet a tápfolyadékból nyerjük ki.

Egy további találmány szerinti megoldás a fentiekben emlí-

tett, azaz a találmány szerinti eljárásban alkalmazott sejttenyésztő médiumra vonatkozik. Ennek megfelelően az egyik megoldás egy olyan, szérummentes sejttenyésztő médiumra vonatkozik, amely (i) a következő komponenseket tartalmazza: víz, egy növényi eredetű pepton, egy ozmolaritás regulátor, egy puffer, egy energiaforrás, aminosavak, egy lipidforrás vagy lipidprekurzor, egy vasforrás, vastól eltérő fémionok, valamint egy vagy több vitamin és ko-faktor, és (ii) nem tartalmaz semmilyen teljes hosszúságú polipeptidet. Előnyösen bármely találmány szerinti sejttenyésztő médium teljesen mentes az állati forrásból származó komponensektől. Az egyik előnyös megoldásban bármely találmány szerinti sejttenyésztő médiumban az energiaforrás glükóz. Egy hasonlóan előnyös megoldás értelmében bármely találmány szerinti sejttenyésztő médiumban a médium 0,3 g/liternél több foszfátot tartalmaz. Egy további előnyös megoldásban bármely találmány szerinti sejttenyésztő médiumban a médium nyomelemeket és egy vagy több vitamint is tartalmaz. A találmány szerinti sejttenyésztő médium további előnyös megoldásai közé tartoznak azok a médiumok, amelyeket a találmány szerinti eljárásban felhasználható médiumokként, illetve a jelen leírás bármely más részében előnyös médiumokként ismertetünk.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan kompozíció is, amely egy, a találmány szerinti eljárással előállított adott rekombináns polipeptidet tartalmaz. Konkrétan, a találmány tárgyát képezi egy olyan kompozíció, amely a találmány szerinti eljárással előállított rekombináns eritropoetint tar-

talmaz.

A jelen találmánnyal kapcsolatban a leírásban ismertetett előnyös vagy egyedi megoldások egymással kombinálhatók, amelyek eredményeként további előnyös megoldásokat nyerhetünk.

Amennyiben másképpen nem definiáljuk, a leírásban alkalmazott valamennyi műszaki és tudományos kifejezést az ezen a területen (például a sejttenyésztés, a molekuláris genetika, a nukleinsav-kémia, a hibridizációs technikák és a biokémia területén) jártas szakember által szokásosan használt értelemben alkalmazzuk. Standard módszereket alkalmazunk a molekuláris, genetikai és biokémiai eljárások [lásd például: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Spier *et al.*, *Encyclopedia of Cell Technology*, Vol 1 & 2, 1st ed. (2000), John Wiley & Sons, Inc.; valamint Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999), 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.] és a kémiai eljárások esetén.

A. Tenyésztőközeg

Az emlős sejtek találmány szerinti tenyésztési eljárásában alkalmazott tenyésztőközeg nem tartalmaz szérumot. Konkrétan és előnyösen a tenyésztőközeg teljesen mentes minden állati eredetű komponenstől, például proteinektől (ezen belül növekedési anyagoktól), aminosavaktól, lipidektől és szénhidrátoktól. Ily módon a médium komponensei legnagyobbbrészt szervesetlen vagy szintetikus anyagok, azaz amelyeket nem közvetlenül állati forrásokból nyerünk. Azonban felhasználhatunk más forrá-

sokból, például növényekből, baktériumokból vagy élesztőkből kivont komponenseket, például egy növényi eredetű peptont. Ezenkívül a tenyésztőközeg mentes minden funkcionális proteintól vagy polipeptidtől, például transferrintől és inzulintól, illetve ezek funkcionális részeitől.

A tenyésztőközeg vizet, ozmolaritás regulátort, puffert, energiaforrást, aminosavakat, lipidforrást vagy lipidprekursor, vasforrást, vastól eltérő fémionokat, valamint egy vagy több vitamint és ko-faktort tartalmaz.

Az ozmolaritás regulátorok általában sók. A médiumban történő felhasználásra alkalmas sók körébe tartozik — egyebek mellett — például a nátrium-klorid, a kálium-klorid és a magnézium-klorid. Az ozmolaritást előnyösen 200-450 mOsm/kg, még előnyösebben 290-350 mOsm/kg értéken tartjuk.

A pH 6,5 és 7,5 közötti, legelőnyösebben 7,0 körüli értéken tartásához puffereket alkalmazunk. Alkalmas pufferek — egyebek mellett — például a karbonátok, például a nátrium-hidrogén-karbonát; valamint a kloridok, szulfátok és foszfátok, például kalcium-klorid-dihidrát, magnézium-szulfát-heptahidrát és nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát, illetve a nátrium-piruvát, amely pufferek általában 0,05-5 g/liter, előnyösen 0,5-5 g/liter mennyiségben vannak jelen a médiumban. Például a médium 2,5 g/liter nátrium-hidrogén-karbonátot tartalmazhat. Az előbbieken más olyan puffereket is felhasználhatunk, amilyen például a 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-etánszulfonsav (HEPES) és a 3-morfolino-propánszulfonsav (MOPS).

Az "aminosavak" kifejezés azt jelenti, hogy mind a 20 ami-

nosav jelen lehet. Az aminosavak előnyösen szintetikus eredetűek. Az aminosavak szokásosan alkalmazott mennyisége az egyes aminosavaktól függően változik, de általában 10 mg/liter és 200 mg/liter közötti mennyiségben vannak jelen a médiumban. Azonban az L-glutamin ennél lényegesen nagyobb koncentrációban, előnyösen 1000-350 mg/liter mennyiségben van jelen. Az aminosavforrást általában egy alaplómédiumra, például DMEM-re (Dulbecco's modified eagle medium) és/vagy Ham's F12-re alapozzuk. Aminosavaknak az alaplómédiumhoz — a gyors fogyasztás ellátása érdekében — történő hozzáadásával egy feldúsított aminosav-kiegészítésű médiumot nyerünk.

A "koncentrátum" kifejezés egy olyan tápoldatot jelöl, amely a médiumnál nagyobb mennyiségben tartalmaz aminosavakat, szója peptont és szénhidrátokat. A koncentrátumhoz adott esetben egy vagy több vitamint, lipidet és/vagy nyomelemet is hozzáadhatunk. A koncentrátum térfogata jellemzően az eredeti térfogat 0,5-30 %-a, legelőnyösebben 1,25-5 %-a. A koncentrátumot az elfogyasztott tápanyagok pótlására alkalmazzuk.

A médiumban alkalmazott energiaforrás általában 3-10 g/liter mennyiségben van jelen, és előnyösen egy monoszacharid, például mannóz, fruktóz, galaktóz vagy maltóz, és legelőnyösebben glükóz, különösen D-glükóz. A médiumban a glükóz kezdeti koncentrációja előnyösen legalább 4 g/liter.

A lipidforrást vagy lipidprekurzort például az olyan lipidfaktorok közül választhatjuk ki, amilyenek — egyebek mellett — a következők: kolin-klorid, tioktánsav (lipoic acid), olajsav, foszfátidil-kolin vagy lineoleát és/vagy a lipidkép-

zódásban részt vevő vegyületek (lipidprekurzorok), például alkohol-aminok, például (2-hidroxi-etil)-amin. Az előnyös lipidprekurzorok közé tartozik a (2-hidroxi-etil)-amin.

A vasforrás szervetlen vagy szerves formában lehet, és jellemzően 0,025 mg/liter és 0,5 mg/liter közötti mennyiségben van jelen. A vasforrások példái közé tartoznak — egyebek mellett — a vas(III)- és a vas(II)-sók, amilyen például a vas(III)-citrát vagy a vas(II)-szulfát. Előnyösek a kelatált sók, amilyen például a vas(III)-citrát és a vas(III)-ammónium-citrát.

A médiumban adott esetben alkalmazott vastól eltérő fémionok közé tartozik — egyebek mellett — például a magnézium, a réz és a cink; valamint a nátrium, a kálium és szelén is. A médium előnyösen szelenitionokat, például nátrium-szelenit formájában lévő szelenitionokat tartalmaz 0,1-100 µg/liter, legelőnyösebben 0,5-25 µg/liter mennyiségben.

A médiumban adott esetben alkalmazott vitaminok és enzim ko-faktor vitaminok (ko-faktorok) körébe tartozik — egyebek mellett — például a következők: B6-vitamin (piridoxin), B12-vitamin (cianokobolamin) és K-vitamin (biotin), amik 0,001-1 mg/liter mennyiségben vannak jelen; C-vitamin (aszkorbinsav), ami 1-10 mg/liter mennyiségben van jelen; B2-vitamin (riboflavin), ami 0,1-1,0 mg/liter mennyiségben van jelen; valamint B1-vitamin (tiamin), niacinamid, B5-vitamin (D-kalcium-pantoténát), folsav, D-inozit, amik általában 2-20 mg/liter mennyiségben vannak jelen.

Nagyméretű fermentorokban az emlős sejtek különösen érzé-

kenyek az edény gázokkal vagy keverőlapáttal végzett keverése miatt fellépő nyíróerőkre. A sejtkárosodások előfordulásának a minimalizálása érdekében előnyös, ha a médium sejtvédőket, például polietilén-glikolt, poli(vinil-alkohol)-okat vagy plu-ron-poliolokat is tartalmaz. Előnyösen lutrol használunk, jellemzően körülbelül 0,1 % koncentrációban.

Ugyancsak előnyös, ha a médiumot egy emésztett peptiddel, egy peptid hidrolizátummal vagy egy peptid extraktummal, például élesztő extraktummal, vagy előnyösen egy növényi eredetű peptonnal egészítjük ki. Ezek előnyös mennyisége 0,025-1 tömeg/térfogat%, legelőnyösebben 0,1-0,5 tömeg/térfogat%. A növényi pepton — egyebek mellett — például rizsből, búzából, borsóból stb. készülhet. Előnyös továbbá, ha foszfátionokat is adunk a médiumhoz. A médium jellemzően 10-1000 g/liter, például 50-150 g/liter, előnyösen körülbelül 120 mg/liter foszfátot tartalmaz.

B. Gazdasejtek

A találmány szerinti eljárásnak megfelelően tenyésztett transzformált gazdasejtek eukarióta sejtek, általában emlős sejtek, például rágcsáló vagy főemlős sejtek. Előnyös gazdasejtek — egyebek mellett — például a CHO, a BHK, a COS és a HeLa sejtek. Különösen előnyös sejtek a CHO sejtek. Az egyik megoldásban a gazdasejteket úgy állítjuk elő, hogy egy adott génre, például dhfr-re nézve kezdetben hiányos sejtvonalat, amit szelekciós hatásra adott válaszreakcióban amplifikálunk (lásd alább), egy, a gént kódoló nukleotid szekvenciával

transzfektálunk (vagy transzformálunk). Egyebek mellett a következő helyen ismertetnek dhfr-hiányos CHO sejteket: Urlaub and Chasin, PNAS, 77, 4216-4220 (1980); ezeket a sejteket például az ATCC-től szerezhethetjük be ATCC CRL-9096 letétként. A sejtek a Budapesti Szerződés előírásainak megfelelően, ATCC PTA-3672 deponálási számon 2001. augusztus 21-én a következő helyen kerültek letétbe helyezésre: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. 20852, Amerikai Egyesült Államok.

A jelen leírásban alkalmazott "transzformáció" kifejezés a genetikai anyagnak egy gazdasejtbe oly módon történő bevezetésére vonatkozik, amelynek eredményeként a genetikai anyag a sejtben (a "transzformált" sejtben) expresszállódik. A félreértések elkerülése érdekében hangsúlyozzuk, hogy a "transzformáció" kifejezés nem terjed ki a sejtek onkogének vagy onkogén vírusok stb. általi immortalizációjára.

A gazdasejt tartalmazza a gazdasejtben expresszálni kívánt adott rekombináns polipeptidet (polypeptide of interest; POI) kódoló nukleotid szekvenciát. A POI előnyösen egy glikozilezett polipeptid, különösen egy olyan glikozilezett polipeptid, amely egy csak emlős sejtek által végrehajtott glikozilezést igényel. Még előnyösebben a polipeptid szialilezett. Egy különösen előnyös POI az eritropoetin, még előnyösebben a humán Epo. Ugyancsak előnyös, ha a POI-t a sejtek a tenyésztőközegbe választják ki (szekretálják).

A rekombináns POI-t kódoló szekvencia operábilisan kötődik azokhoz a regulátor kontroll szekvenciákhoz, amelyek a gazda-

sejtben a POI expresszióját irányítják. Előnyösen a nukleotid szekvencia a gazdasejt genomjába van integrálva. A POI-kat kódoló nukleotid szekvenciák bevezetésére különféle eljárások ismertek a szakterületen (lásd például: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.].

Az egyik megoldásban a nukleotid szekvencia a gazdasejt genomjában van integrálva és operábilisan kötődik egy második olyan szekvenciához, amely ha a gazdasejt genomba integrálódik, amplifikálódik, amikor a gazdasejt egy olyan szelekciós szerrel érintkezik, amely a nukleotid szekvencia amplifikációját okozza. Az eukarióta sejtek, különösen az emlős sejtek egy szelektív hatásra, jellemzően egy enzim inhibitorral adott válaszreakcióban képesek bizonyos géneket amplifikálni, amelynek eredményeként emelkedik az adott gén másolatainak a száma, ami viszont fokozza a gén expressziójának a mértékét. A további génmásolatok intrakromoszomális állapotban vagy extrakromoszomális genetikai anyag, például "minute" kromoszómák formájában tarthatók [lásd például: Genes VI, Lewin (1997), Oxford University Press, Oxford, U.K., pp. 975-978]. Az egyik alaposan vizsgált és jól karakterizált példa a dihidrofolát-reduktáz (dhfr) gén, ami egy metotraxátra (MTX) adott válaszreakcióban amplifikálódik. A további példák közé tartozik a CAD gén (ami egy, az UMP szintézis első három lépésében részt vevő proteint kódol), ami a transzkarbamiláz inhibitoraira adott válaszreakcióban amplifikálódik, valamint a glutamin szintetáz (lásd: WO 87/04462. számon közzétett nemzetközi szabadalmi be-

jelentés), ami egy metionin-szulfoximinre adott válaszreakcióban amplifikálódik. Előnyösen a második nukleotid szekvencia a dhfr-t kódolja.

C. Tenyésztési eljárások

A találmány szerinti eljárásnak megfelelően a gazdasejteket a POI expresszióját lehetővé tevő körülmények között a találmány szerinti tenyésztőközegben tenyésztjük. Az eukarióta sejtek, például az emlős sejtek rendkívül sokféle formátumban és tenyésztőedényben tenyésztethetők. Például a sejteket tenyésztjük műanyag palackok vagy edények aljára tapadt formában, vagy a kevertetett lombikok/bioreaktorokban lévő szuszpenziók formájában, illetve forgó edény tenyészetekben. Mivel a találmánynak az a célja, hogy a POI-t ipari mennyiségekben állítsuk elő, a POI-t előnyösen bioreaktorokban, különösen olyan bioreaktorokban növesztjük, amelyek alkalmasak szakaszos betáplálásra és legalább 4 literes kapacitásúak.

A sejteket jellemzően körülbelül 5×10^5 sejt/ml sűrűséggel oltjuk a tenyésztőközegre. Az optimális érték a különböző sejttípusoknál eltérhet. Az optimális értéket az ezen a területen jártas szakember meg tudja határozni. A pH-t jellemzően körülbelül 7,0-re állítjuk be, a hőmérséklet jellemzően 37 °C (bár bizonyos sejtvonalakat, például rovar sejtvonalakat alacsonyabb hőmérsékleten növesztünk), és a pO₂ körülbelül 50 %-os levegő szaturációnak megfelelő.

Ahol a gazdasejt a genomjába integrálva egy, a POI-t kódoló nukleotid szekvenciához operábilisan kötött dhfr gént (vagy

egy dhfr gén ekvivalenst) tartalmaz, alkalmas mennyiségben metotrexátot (vagy metotrexát ekvivalenst) adhatunk a médiumhoz. Az egyik előnyös megoldásban azonban a termelő fázis ideje alatt nem adunk metotrexátot a médiumhoz, mivel azt tapasztaltuk, hogy metotrexát nélkül jobb glikozilezési eredmények érhetők el.

A sejteket — a sejtvonaltól és a rekombináns POI-tól függően — jellemzően körülbelül 7-14 napon keresztül tenyésztjük. A tápanyagok elfogyásának a megelőzése érdekében ez alatt az idő alatt friss médium hozzáadására van szükség. Előnyösen egy legalább egy aminosavat, egy szénhidrátot és egy növényi eredetű peptont tartalmazó dúsított tápanyag-koncentrátum hozzáadásával meghosszabbítjuk a tenyésztés idejét. Az aminosavat 0,05 g/liter és 50 g/liter közötti mennyiségben, a szénhidrátot 2 g/liter és 1000 g/liter közötti mennyiségben, a peptont pedig 2 g/liter és 1000 g/liter közötti mennyiségben adjuk a rendszerhez. Legelőnyösebben az aminosavat 0,5 g/liter és 5 g/liter közötti mennyiségben, a szénhidrátot 25 g/liter és 75 g/liter közötti mennyiségben, a peptont pedig 25 g/liter és 75 g/liter közötti mennyiségben adjuk a rendszerhez.

Az egyik előnyös találmány szerinti megoldásban az energiaforrás, például a glükóz koncentrációját a tenyésztési folyamat egész ideje alatt legalább 3 g/liter értéken, jellemzően 3 g/liter és 4 g/liter közötti értéken tartjuk.

Egy további igen előnyös megoldásban — a pH konstans 7,0-es értéken tartása helyett — a pH kezdeti értéke nagyobb, mint 7,0, például 7,1, és a tenyésztési folyamat ideje alatt ezt az

értéket 7,0-nál kisebb, például 6,9-es értékre. Tehát egy neutrális pH feletti értéket egy neutrális pH alatti értékre to-
lunk el, azzal a megkötéssel, hogy a pH mindvégig a gazdasej-
tek által tolerálható határokon belül marad. A pH-változtatást
jellemzően meghatározott idő alatt, például legalább 6 vagy 96
óra alatt, legelőnyösebben 72 óra alatt hajtjuk végre.

A humán eritropoetin esetében a sejtek által termelt re-
kombináns POI mennyisége előnyösen legalább 200 mg/liter, pél-
dával több, mint 300 vagy 400 mg/liter.

A rekombináns proteint a tenyészet felülúszójából vagy a
tesnyésztett sejtek üledékéből (az Epo expressziója esetében a
tenyészet felülúszójából) nyerhetjük ki. A rekombináns prote-
int ezt követően jellemzően egy vagy több tisztítási lépésnek
vetjük alá [lásd például: Broudy *et al.*, ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY
AND BIOPHYSICS, 265, 329-336 (1988); Ghanem *et al.*, PREPARATIVE
BIOCHEMISTRY, 24 (2), 127-142 (1994)], például affinitás kroma-
tográfiával és/vagy ioncserés kromatográfiával tisztítjuk. Az
előállítási példáknál további, a találmány szerinti sejtte-
nyésztési eljárással előállított eritropoetin kinyerésére al-
kalmas eljárásokat ismertetünk.

Egy, a találmány szerinti eljárással rekombináns sejtekben
expresszált és tisztított rekombináns polipeptidet, különösen
Epo-t tartalmazó kompozícióban a rekombináns polipeptid elő-
nyösen lényegében tiszta, például legalább 90 %-os, 95 %-os
vagy 99 %-os tisztaságú.

A tisztított protein biológiai aktivitását meghatározhat-
juk *in vitro* és/vagy *in vivo*. Egy alkalmas *in vitro* vizsgálá-

tot, amelynek során egy eritroid sejtvonal proliferatív stimulációját teszteljük, a következő közleményben ismertettek: Hammerling et al., J. PHARM. BIOMED. ANAL., 14 (11), 1455-1469 (1996). Egy alkalmas *in vivo* tesztet Ghanem és munkatársai írtak le [Ghanem et al., PREPARATIVE BIOCHEMISTRY, 24 (2), 127-142 (1994)], amelynek során azt határozzák meg, hogy az ⁵⁹Fe milyen mértékben épül be cythaemiás egerek vörösvérsejtjeibe.

Az egyik előnyös megoldásban a találmányt a következő nukleinsav vektorok és gazdasejtek alkalmazásával valósítjuk meg:

- (a) egy első polinukleotid vektor, amely tartalmaz (i) egy első polinukleotid szekvenciát, amely egy adott rekombináns polipeptidet kódol; és (ii) egy szelektálható markert kódoló második nukleotid szekvenciát, amely második nukleotid szekvencia amplifikálódik, ha a gazdasejt egy szelekciós szerrel érintkezik; és
- (b) egy második polinukleotid vektor, amely alapvetően ugyanolyan nukleotid szekvenciával rendelkezik, mint az első polinukleotid vektor, azzal az eltéréssel, hogy a második nukleotid szekvenciát egy eltérő szelektálható markert kódoló harmadik nukleotid szekvencia helyettesíti; és

az első polinukleotid vektor és a második polinukleotid vektor a gazdasejt genomjába van integrálva.

Előnyösen a gazdasejt egy emlős sejt, még előnyösebben egy CHO (Chinese hamster ovary) sejt.

Előnyösen a második nukleotid szekvencia egy dihidrofolát-reduktáz polipeptidet kódol, valamint a szelekciós szer metotrexát.

Az eritropoetint a sejttenyészetből úgy tisztíthatjuk, hogy (a) a sejttenyésztő médiumból "disc stuck" szeparátor alkalmazásával végzett centrifugálással és ezt követően végzett mélyszűréssel ("depth filtration") eltávolítjuk a gazdasejteket, a sejtalkotókat és a sejttöredékeket, amelynek eredményeként egy tisztított tenyésztőközeg felülúszót nyerünk; (b) a felülúszó vezetőképességét legfeljebb 5 mS/cm értékre, pH-ját pedig 7,0 és 8,0 közötti értékre állítjuk be; (c) a (b) lépésből származó felülúszót egy anioncserélő kromatográfiás közeget tartalmazó oszlopra visszük, az oszlopot mossuk, ezt követően az oszlopról eluáljuk az rhEpo-t, majd az rhEpo-t tartalmazó csúcsfrakciókat egyesítjük; (d) a (c) lépésben nyert egyesített csúcsfrakciót közepes (< 10 bar) nyomás alatt működtethető és a nátrium-hidroxid nagy koncentrációival szemben ellenálló polisztirol gyanta alkalmazásával végzett fordított (reverz) fázisú kromatográfiás oszlopra visszük, majd az oszlopról egy szerves lineáris gradiensek alkalmazásával eluáljuk az rhEpo-t; (e) a (d) lépésben nyert, rhEpo-t tartalmazó egy vagy több frakciót felvisszük egy Sepharose anioncserélő gyantát tartalmazó oszlopra, az oszlopot mossuk, majd az oszlopról egy lineáris só-gradiens alkalmazásával eluáljuk az rhEpo-t; (f) az (f) lépésben eluált, rhEpo-t tartalmazó frakciók közül az rhEpo szialilizettségének a mértéke (foka) alapján kiválasztunk egy vagy több frakciót; és (g) az (f) lépésben nyert, rhEpo-t tartalmazó egy vagy több frakciót gélszűrőses közeg alkalmazásával végzett egy vagy több méretkizárásos kromatográfiás lépésben kromatografálunk, és így eltávolítjuk

a potenciális dimereket és nagyobb aggregátumokat; és összegyűjtjük az rhEpo-t tartalmazó eluátumot.

A (c) lépésben alkalmazott anioncserélő közeg előnyösen a kerámia alapú Q-HyperD FTM (BioSeptra) ioncserélő közeg. A (d) lépésben használt polisztirol gyanta előnyösen Source 30RPCTM (Pharmacia) gyanta, míg az (e) lépésben alkalmazott anioncserélő közeg előnyösen Pharmacia Q Sepharose High PerformanceTM anioncserélő. A (g) lépésben használt gélszűrési közeg előnyösen Pharmacia Superdex 75 prep gradeTM közeg.

A leírásban az előállítási példáknál ismertetünk ilyen eljárásokat.

Az alábbiakban példákon keresztül ismertetjük a találmány további részleteit. A példák kizárólag a találmány szemléltetésére szolgálnak, a találmány oltalmi körét, illetve terjedelmét nem korlátozzák. A példák elsősorban az előnyös találmány szerinti megoldásokat mutatják be.

PÉLDÁK

Anyagok

Gazdasejtvonalak

Dihidrofolát-reduktáz hiányos CHO (Chinese hamster ovary) sejtek (ATCC CRL-9096). A sejtek a Budapesti Szerződés előírásainak megfelelően, ATCC PTA-3672 deponálási számon 2001. augusztus 21-én a következő helyen kerültek letétbe helyezésre: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. 20852, Amerikai Egyesült Államok.

Sejttenyésztő közegek

Tenyésztőközeg:	DMEM kiegészítve a következőkkel: L-glutamin, 4 mM, 10 % FCS, HT (hipoxantin, timidin), 1x
Szelekciós közeg:	DMEM kiegészítve a következőkkel: L-glutamin, 4 mM, dializált FCS, 10 % és G418, 0,5 mg/ml
Amplifikációs közeg:	DMEM kiegészítve a következőkkel: L-glutamin, 4 mM, dializált FCS, 10 %, G418, 0,5 mg/ml és MTX (metotrexát), $4,8 \times 10^{-8}$ M - $1,54 \times 10^{-6}$ M
Fagyasztóközeg:	DMEM kiegészítve a következőkkel: L-glutamin, 4 mM, dializált FCS, 10 % és DMSO, 10 %
Szérummentes adaptációs médium rekombináns sejtvonalakhoz	1:1 DMEM/Ham's F12 kiegészítve a következőkkel: L-glutamin, 6 mM, szója-pepton/UF, 0,25 %, Hybridoma Supplement, 1x, Pluronic-F68, 0,1 % G418, 0,5 mg/ml, MTX, $1,54 \times 10^{-6}$ M
Szérummentes termelő médium	1:1 DMEM/Ham's F12 kiegészítve a következőkkel: szója-pepton/UF, 0,25 %, Hybridoma Supplement, 1x, Lutrol, 0,1 %, MTX, $1,54 \times 10^{-6}$ M, glükóz, 1 g/liter, NaHCO_3 , 2,5 g/liter
Szérummentes fagyasztó-	PBS, PVP-10, 20 %, DMSO, 5 %,



közeg rekombináns	Hybridoma Supplement, 100x,
sejtvonalakhoz	etanol-amin, $2,5 \times 10^{-3}$ M
	vas(III)-citrát, $2,5 \times 10^{-2}$ M,
	L-aszkorbinsav, $2,0 \times 10^{-3}$ M,
	nátrium-szelenit, $5,0 \times 10^{-6}$ M

Plazmid konstrukciók

pEpo/neo

Ez a plazmid az Epo kódoló régióját és a neomicin rezisztens gént mint két különböző expressziós kazettát kódolja, amelyek mindegyikét az SV40 korai promoter/terminátor szekvenciák kontrollálják. A konstrukció részleteit az 1. példában ismertetjük.

pEpo/dhfr

Ez a plazmid az Epo és a dhfr kódoló régióját mint két különböző expressziós kazettát kódolja, amelyek mindegyikét az SV40 korai promoter/terminátor szekvenciák kontrollálják. A konstrukció részleteit a 2. példában ismertetjük.

Sejttenyésztő eljárások

CHO-dhfr tenyésztés

Dihidrofolát-reduktáz hiányos CHO (a továbbiakban: CHO-dhfr) sejteket [Urlaub et al., PNAS, 77 (7), 4216-4220 (1980)] hetente kétszeri 1:1 arányú megosztás mellett DMEM tenyésztőközegben tenyésztünk.

A CHO sejtek transzfekciója

A lipofektin transzfekció előtt egy nappal 25 cm^2 -es T-lombikokban (T-flask) vagy 96-vájtató lemezekben $1-5 \times 10^4$



sejt/cm² sűrűséggel leoltjuk a sejteket. A megfelelő arányban összekeverjük a megfelelő plazmidokat, majd a gyártó előírásait betartva (0,5-1 µl/cm² hozzáadjuk a lipofectin reagenshez (GIBCO/BRL). Ezt követően a sejtek fölé rétegeltjük a szérumentes DMEM-mel készített transzfekciós koktélt, majd 4-16 órával később a DNS-tartalmú médiumot lecseréljük a tenyésztőközegre. A transzfektált sejteket először szelekciós médium konfluenssé válásig, ezt követően amplifikációs közegben (4,8 × 10⁻⁸ M MTX) tenyésztjük, majd a sejttenyészet felülúszókat ELISA-val az Epo-termelésre nézve szkríneljük. Meghatározzuk a legnagyobb termelőket, az MTX koncentrációt a kétszeresére növeljük, majd a legjobb termelőket alkalmazzuk a további tenyésztéshez.

Analitikai módszerek

Az Epo ELISA detektálása különböző mátrixokban

Antitestek

poliklonális szérum: nyúl anti Epo biotinilezett (R&D Systems; katalógusszám: AB-286-NA)

monoklonális antitest: egér anti Epo (Genezyme; katalógusszám: AE7A5)

ELISA pufferek

Bevonó puffer: 8,4 g/liter NaHCO₃, 4,2 g/liter Na₂CO₃,
pH 9,6-9,8.

Mosó puffer: 0,2 g KCl, 1,15 g/liter Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 0,2 g/liter KH₂PO₄, 8 g/liter NaCl, 0,1 % Tween 20

Hígító puffer: mosópufferben 2 % PVP (Sigma katalógusszám:



PVP-4OT)

Mintapuffer: hígítópufferben 0,5 % alfa-monotio-glicerín

Festő puffer: 7,3 g/liter citromsav-dihidrát, 11,86 g/liter

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, pH 4,8-5,0

Festő oldat: 100 μl OPD oldat/10 ml festőpuffer

5 μl H_2O_2 /10 ml festőpuffer

OPD törzsoldat: PP:L0017

Módszer

Az alkalmazott ELISA eljárás a ng/ml nagyságrendű koncentrációtartományban, különösen a 10 ng/ml körüli koncentrációtartományban detektálja az Epo-t, ahol 500 ng/ml koncentrációval indítjuk a vizsgálatot, majd nyolc darab kétszeres hígítást készítünk. Egy, az Epo első 26 aminosavával szembeni, bevonóréteggént funkcionáló monoklonális antitest köti az Epo-t. A következő lépésben a befogó antitesttel specifikusan megkötjük az Epo-t. A detektálást egy biotinilezett Epo felismerő nyúl antiszérumon keresztül valósítjuk meg. A láthatóvá tételt (vizualizálást) úgy végezzük, hogy miután streptavidin-peroxidzt kapcsolunk a lemezhez, OPD-vel megfestjük a lemezt.

Immunofluoreszcencia

Egy 6-vájtató lemezben egy fedősávon 5×10^4 sejt/200 μl koncentrációval inokuláljuk az Epo-expresszázó CHO-sejteket. A megtapadt (adherens) sejteket foszfátpufferelt fiziológiás nátrium-klorid-oldattal (PBS) kétszer mossuk, majd metanol -20°C -on 5 percen keresztül fixáljuk. A nonspecifikus proteinek PBS-sel készített 20 %-os FCS-sel 15 percen keresztül inkubálva szaturáljuk, majd az anti-Epo-t egy órán át inkubáljuk. A

reakciót FITC konjugátált anti-egér IgG-vel vizualizáljuk. A floureszcenciát konfokális mikroszkóppal, 488 nm-es gerjesztési hullámhossznál és 515 nm-nél nagyobb emissziós hullámhossznál detektáljuk.

Nukleuszméret-meghatározás

Anyagok

Coulter Counter[®] Model ZM (Coulter Electronics Inc.)

Coulter Channelyzer[®] Model 256

Inkubációs oldat: citromsav, 0,1 M, Triton X, 2 %

Electrolyte Isoton II (katalógusszám: 844 8011; Coulter Euro Diagnostic GmbH)

A Coulter Counter azoknak a részecskéknek a méretét és számát határozza meg, amelyek egy elektromosan vezető folyadékban vannak szuszpendálva. A folyadékot vákummal egy olyan kapillárison keresztül abszorbeáljuk, amely mindkét oldalán elektródokat hordoz. Az ellenállás változása feszültségimpulzust indukál, ami a Coulter Channelyzer-rel digitalizálható. A nukleuszméret a sejtek DNS-tartalmával arányos, így lehetővé válik, hogy megkülönböztethessük a kromoszómáknak egy diploid és egy poliploid halmazát.

Módszer

Hozzávetőleg 1×10^6 CHO-sejtet PBS-ben egyszer mosunk, ezt követően 2 ml inkubációs oldatban szuszpendálunk, majd a szuszpenziót 4-5 órán keresztül állni hagyjuk. A következő lépések a Coulter Counter-re specifikusak.

SDS poliakrilamid-elektroforézis és Western blotting

Anyagok

SDS gélek:	Novex Tris-Glycine 4-20 %
Mintapuffer:	Tris Glycine SDS 2x (Novex LC 2676)
Futtató puffer:	Tris Glycine SDS (Novex LC 2675)
Blotting puffer:	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 50 mM, SDS, 0,1 %, meta- nol, 20 %
Blotting mátrix:	PVDF Immobilon P 0,45 μM Millipore; K8JM8238M
Mosó puffer:	lásd: ELISA mosópuffer
Hígító puffer:	NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M, pH 9,5

Módszer

Az Epo-tartalmú mintákat 1 % α -MTG-t tartalmazó 1x mintapufferben 30 ng/20 μl koncentrációra állítjuk be, majd az SDS gélre visszük. A futtatás végén a proteineket egy PVDF immobilon membránhoz blottoljuk, majd két órával később az Epo-t egy, az Epo első 26 aminosavát detektáló monoklonális antitesttel specifikusan megfestjük. Alkálikus foszfatázhoz konjugált anti-egér IgG-vel és NBT/BCIP festéssel vizualizálást végzünk.

Izoelektromos fókuszálás

Anyagok

Rendszer: Multiphor II, Amersham Biosciences

IPG gélek: pH 2,5-7

Újraduzzasztó puffer: 9 g karbamid, 0,5 g CHAPS, 0,04 g
DTE, 0,5 ml resolytes (pH 3,5-10), 10

	μl brómfenolkék (0,1 %), vízzel 25 ml-re feltöltve
Mintapuffer:	IPG mintapuffer, pH 3-10, 25 μl 625 μl vízben
Blotting puffer:	2,93 g glicin, 5,81 g Tris, 20 ml metanol, 0,375 g SDS, vízzel 1000 ml-re feltöltve
Blotting mátrix:	PVDF Immobilon P 0,45 μM Millipore; K8JM8238H
Mosó puffer:	lásd: ELISA mosó puffer
Hígító puffer:	mosó pufferben 1 % tejpor
Detektáló puffer:	NaCl, 0,1 M, Tris-HCl, 0,1 M, pH 9,5

Módszer

Az Epo-tartalmú mintákat 500-1000 ng/50 μl koncentrációra állítjuk be, sómentesítjük, mintapufferrel 1:1 arányban meghígítjuk, majd felvisszük az újraduzzasztott IPG gélre. A futtatást az első egy percben 300 V-tal végezzük, ezt követően a feszültséget lineárisan 3500 V-ra növeljük, majd a végén egy órán keresztül tartjuk a 3500 V-ot. A teljes fókuszálási eljárás ideje alatt 10 mA és 10 W limitet állítunk be. Ezt követően a proteineket egy éjszakán keresztül végzett diffúzióval vagy elektroblottal egy PVDF immobilon membránhoz blottoljuk, majd az Epo-t egy, az Epo első 26 aminosavát detektáló monoklonális antitesttel specifikusan megfestjük. Alkálikus foszfatázhoz konjugált anti-egér IgG-vel és NBT/BCIP festéssel vizualizálást végzünk.

A DNS-tartalom meghatározása

FACS analízissel összehasonlítjuk a rekombináns sejtvonalak és a CHO-dhfr gazdasejtvonalak DNS-tartalmát.

Anyagok

Mosó puffer: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X100

Festő puffer: mosó pufferben 0,3 µg/ml DAPI (Hoechst)

Módszer

5×10^5 sejtet PBS-ben mosunk és jéghideg 70 %-os etanollal fixálunk. Ezt követően a sejteket mosó pufferrel kétszer mossuk, majd festő pufferben 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. FACS Vantage (Becton and Dickinson) alkalmazásával, 359 nm gerjesztési hullámhossznál és 450 nm emissziós hullámhossznál mérjük a DNS-tartalmat.

In vitro specifitás teszt

A TF-1 humán eritroleukémia sejtvonala (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) növekedése IL3 vagy hGM-CSF dependens. Ezek a citokinek szinergetikus hatást gyakorolnak a proliferációra, miközben az Epo bizonyos ideig megtartja az életképességét. A sejteket GM-CSF-et és Epo-t tartalmazó tenyésztőközegben rutinszerűen tenyésztjük.

Teszt kiegészítők

Tenyésztőközeg: RPMI 1640, kiegészítve a következő komponensekkel: 4 mM Gln, 10 % FCS, 20 µg/ml transferrin, 10 µM béta-merkaptó-etanol, 12 ng/ml rhGM-CSF, 3 E/ml rh Epo

Teszt médium: RPMI 1640, kiegészítve a következő kompo-



nensekkel: 4 mM Gln, 100 µg/ml transzfer-
rin, 2 mg/ml BSA

Módszerek

A funkcionalitás tesztet egy 96-vájatú lemezeken végzett MTT életképességi teszt formájában hajtjuk végre [Hammerling *et al.*, J. PHARM. BIOMED. ANAL., 14 (11), 1455-1469 (1996)]. A mintákat tesztmédiiummal nyolc alkalommal 1:1 arányban hígítjuk, ahol a hígítást 100 ng Epo/ml koncentrációval kezdjük. Minden egyes mintaoldatból, standard hígításból vagy vak mintából 50 µl-t felviszünk a 96-vájatú tesztlemezre. TF-1 sejteket hideg PBS-sel háromszor mosunk, majd a tesztmédiumban a koncentrációt 2×10^5 sejt/ml értékre állítjuk be. A 96-vájatú lemez minden egyes vájatarára 50 µl sejtszuszpenziót rétegelünk, majd a sejteket 72 órán keresztül CO₂ inkubátorban hagyjuk. Ezt követően a vájatokhoz 10 µl MTT-t (PBS-ben 6 mg/ml) adunk, majd a lemezt 4 órán keresztül 37 °C-on inkubáljuk. A festéket feloldjuk 100 µl SDS/HCl-ben (0,1 M sósavoldatban 10 % SDS), további 4 órán keresztül sötétben tartjuk, majd 550/690 nm hullámhossznál fotometriásan meghatározzuk az Epo dependens életképességet.

1. példa

Az Epo/neo plazmid felépítése

1. A p2-neo felépítése

1.1. A vektor fragmentumnak az SV40 korai promotert tartalmazó pSV2neo-ból történő előállítás

A vektor konstrukció alapját a pSV2neo által tartalmazott

Az *EcoRI* és a *HindIII* restriktációs enzimekkel elhasítjuk a pSV2neo plazmidot (ATCC 37149). Az így nyert két fragmentum mérete 3092 bp és 2637 bp. A 2637 bp fragmentum egy pBR322 gerincet magában foglaló *EciRI*-*PvuII* restriktációs fragmentumból és egy szomszédos, az SV40 korai promoternak egy fragmentumát tartalmazó *PvuII*-*HindIII* fragmentumból áll. A 2637 bp fragmentumot gélelektroforézissel állítjuk elő és tisztítjuk.

A neo gént a pSV2neo Tn5 transzpozonjából nyerjük. Az amplifikációt egy kizárólag a gén kódoló szakaszát tartalmazó fragmentum formájában hajtjuk végre. A klónozási stratégia részeként mindkét végnél felismerő helyeket vezetünk be a restrikciós endonukleázok számára. Az upstream amplifikációs primerbe egy *Hind*III helyet, míg a downstream primerbe egy *Spe*I helyet építünk be. Az amplifikált szakasz a pSV2neo szekvenciájában a 2846-1938 nukleotidoknak felel meg (Genbank nyilvántartási szám: U022434). Az oligonukleotidokat az alábbiaknak megfelelően tervezzük:

1. SZ. SZEKV.

5' *Hind*III: aagctt – g (= 2846. poz. pSV2neo-ban) ttggaagccctg..... 2. SZ. SZEKV.



Oligo 2004-02: hosszúság: 42mer

5'- ggg gga ttc act agt gag tcc cgc tca gaa gaa ctc gtc aag -3'

3. SZ. SZEKV.

5' EcoRI/Spel: gaa ttc actagt – g (=1938. poz. pSV2neo-ban) agtcccgcctcagaa 4. SZ. SZEKV.

A 2004-01 és a 2004-02 primerek amplifikációs termékét *Pwo* polimeráz (Roche Diagnostics) alkalmazásával végzett PCR-rel állítjuk elő. Az eljárás paraméterei a következők: 20 ng pSV2neo, 10 pmol primer, 10 mmol dNTPs, 2,5 E *Pwo* polimeráz összesen 50 µl térfogatú kiegészített pufferben; hőmérsékleti profil: 5 perc 95 °C, 35-ször (30 másodperc 95 °C, 20 másodperc 65 °C, 90 másodperc 72 °C), 3 perc 72 °C, további felhasználásig hűtés 4 °C-on.

Az így nyert 935 bp DNS-fragmentumot DNS-izolációs oszlopokon (Mini, Wizard Promega GmbH) tisztítjuk, *EcoRI*-vel és *HindIII*-mal feltárjuk, majd Spin oszlopok (Supelco) alkalmazásával agaróz gélen eluálva tisztítjuk.

1.3. A p1-neo felépítése

Az amplifikált *EcoRI-HindIII* neo gén fragmentumot Ligation Express (Clontech) alkalmazásával a pSV2-neo-ból származó *EcoRI-HindIII* fragmentumhoz kapcsoljuk, majd *Escherichia coli* gazdasejtbe [*E. coli* SURE (Stratagene)] transzformáljuk. A transzformánsokat 50 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon végzett tenyésztéssel szelektáljuk.

A klónokból izoláljuk a plazmid DNS-t, majd *EcoRI* + *NcoI* alkalmazásával végzett restrikciós analízissel ellenőrizzük a plazmid DNS-t (3 fragmentum: 2527 bp, 780 bp és 251 bp). A várt fragmentumokat mutató plazmid DNS-eket a konstrukciók

1.4. Az SV40LtpoliA/IVS SV40 terminációs szakasz előállítása

Oligo 2004-05: hosszúság: 40mer

5' *Spel*: actag – t (= 1598. poz. pSV2neo-ban) ttgtgaagga..... 6. SZ. SZEKV.

Oligo 2004-06: hosszúság: 46mer

5' *EcoRI*/*Bam*HI: gaattc – g (= 751. poz. pSV2neo-ban) gatcc agacatgataaq.. 8. SZ. SZEKV.

A 2004-05 és a 2004-06 primerek amplifikációs termékét *Pwo* polimeráz (Roche Diagnostics) alkalmazásával végzett PCR-rel, a fentiekben ismertetetteknek megfelelően állítjuk elő. Az így nyert 873 bp DNS-fragmentumot DNS-izolációs oszlopok alkalmazásával tisztítjuk, *EcoRI*-vel és *SpeI*-gyel feltárjuk, majd gélen tisztítjuk.

1.5. A p2-neo felépítése

A p1-neo plazmid DNS-t *EcoRI* + *SpeI* alkalmazásával feltárjuk. Az így nyert linearizált fragmentumot tisztítjuk, az SV40LTpoliA/IVS-t tartalmazó amplifikált fragmentummal kapcsoljuk és egy *E. coli* gazdasejtbe transzformáljuk. A transzformánsokat 50 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon végzett tenyésztéssel szelektáljuk.

A klónokból izoláljuk a plazmid DNS-t, majd *EcoRI* (1 darab 4411 bp fragmentum) és *NcoI* (2 darab 3631 bp és 780 bp fragmentum), valamint *SphI* (3 darab 3499 bp, 840 bp és 72 bp fragmentum) alkalmazásával végzett restrikciós analízissel ellenőrizzük a plazmid DNS-t. A várt fragmentumokat mutató plazmid DNS-eket a konstrukciók szekvencia releváns részeivel tovább ellenőrizzük. Az igazolt SV40LTpoliA/IVS-t tartalmazó plazmid DNS-t p2-neo jelöléssel látjuk el.

2. A p3 plazmid felépítése

2.1. Az SV40 korai promoter fragmentum előállítás

Az SV40 korai promoter fragmentum forrásaként pSV2neo plazmidot alkalmazunk. A fragmentum mérete csaknem ugyanolyan, mint annak a fragmentumnak a mérete, amit a p2 plazmidok felépítése során használtunk. Azonban a fragmentum végei módosítva vannak a *BamHI* és *NotI* felismerési helyek bevezetéséhez. A promoter amplifikálásához alkalmazott oligonukleotid primereket az alábbiaknak megfelelően tervezzük:

Oligo 2004-07: hosszúság: 38mer

5'- ggg ggg atc ctg tgg aat gtg tgt cag tta ggg tgt gg -3' 9. SZ. SZEKV.

5' *Bam*HI: ggatcc - t (= 3435. poz. pSV2neo-ban) gtggaat..... 10. SZ. SZEKV.

Oligo 2004-08: hosszúság: 46mer

5'- ggg ggc ggc cgc agc ttt ttg caa aag cct agg cct cca aaa aag c -3' 11. SZ. SZEKV.

5' *Not*I: gcggccgc - a (= 3093. poz. pSV2neo-ban) gcttttgcaaaag..... 12. SZ. SZEKV.

A 2004-07 és a 2004-08 primerek amplifikációs termékét *Pwo* polimeráz (Roche Diagnostics) alkalmazásával végzett PCR-rel, a fentiekben ismerttetetteknek megfelelően állítjuk elő. Az így nyert 365 bp DNS-fragmentumot DNS-izolációs oszlopok alkalmazásával tisztítjuk, *Eco*RI-vel és *Spe*I-gyel feltárjuk, majd gélen tisztítjuk.

2.2. A pBluescript vektor rész előállítása

pBluescript II SK-t és DNS-t egymás után *Bam*HI és *Not*I alkalmazásával kezelünk. A DNS-t alkálikus foszfatáz alkalmazásával defoszforiláljuk. A kapcsolás előtt a kis fragmentumból a *Bam*HI/*Not*I fragmentumot agarózgél-elektroforézis útján tisztítjuk.

2.3. A p3 plazmid előállítása és igazolása

Az SV40 korai promotert tartalmazó amplifikált *Bam*HI/*Not*I fragmentumot T4 DNS Ligase (Promega GmbH) alkalmazásával be-
kötjük az előállított pBluescript II SK + vektor szerkezetbe. *E. coli* SURE (Stratagene) transzformánsokból plazmid DNS-t izolálunk, amelynek során a kolóniákból 100 mg/ml ampicillin-
nel kiegészített LB médiumon izoláljuk és tisztítjuk a plazmid

DNS-t.

Az így nyert DNS-eket *EcoRI* + *NcoI* alkalmazásával végzett restrikciós analízissel ellenőrizzük (3039 bp és 253 bp).

A várt fragmentumokat mutató két plazmid DNS-t szekvencia-meghatározással tovább ellenőrizzük. Az SV40 korai promoter mindkét szála esetén elvégezzük a szekvencia-meghatározást, és így minden egyes pozíciót leellenőrizzünk. A plazmidot p3 jelzéssel látjuk el.

3. A humán Epo cDNS izolálása

3.1. A teljes RNS TRIzol[®] reagenssel végzett izolálása

Az Epo RNS-nek humán veseszövetekből történő izolálására alkalmazott TRIzol[®] reagens fenol és guanidin-izotiocianát egyfázisú oldata (a humán veseszöveteket a Lainzer Krankenhaus bocsátotta a rendelkezésünkre). A sejtlízis során a guanidin-izotiocianát egy vízoldható komplexet képez az RNS-sel, miközben a sejtek elroncsolódnak. Kloroform hozzáadása, majd centrifugálás után a keveréket elválasztjuk egy RNS-tartalmú vizes fázisra és egy szerves fázisra. A vizes réteg elkülönítése után az RNS-t izopropil-alkohollal precipitáljuk, etanolal mossuk, levegőn szárítjuk, majd RNáz-mentes vízben szuszpendáljuk.

A humán veseszövet fragmentumokat apró darabokra vágjuk, átpaszírozzuk egy 100 μm -es sejtszűrőn (cell stariner), centrifugáljuk (179 $\times$ g/10 perc), majd az így nyert üledéket foszfátpufferelt fiziológiás nátrium-klorid-oldattal (PBS) háromszor mossuk. Ezt követően az üledéket PBS-ben szuszpendáljuk,



steril csövekbe részekre osztjuk, -196°C -ra hűtjük, majd a további felhasználásig -80°C -on tároljuk.

A lefagyasztott szövetet 1 ml TRIzol[®] reagens hozzáadásával lizáljuk, homogenizáljuk, majd teljes disszociáció biztosítása érdekében 5 percen keresztül $15-30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk. 200 μl kloroform hozzáadása után a csövet összerázzuk, 2-3 percen keresztül $15-30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk, majd 10 percen át $12\,000 \times g$ értékkel centrifugáljuk. A centrifugálást követően a felső vizes fázist óvatosan átvisszük egy friss csőbe, összekeverjük 500 μl izopropil-alkohollal, majd 10 percen keresztül $15-30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk. A kicsapódott RNS-t centrifugáljuk ($12\,000 \times g$, 10 perc), az üledéket etanollal mossuk, ismét centrifugáljuk, levegőn szárítjuk, majd RNáz-mentes DEPC vízben oldjuk. A teljes RNS-tartalmat fotometriás úton 260 nm hullámhossznál mérjük.

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g RNS/ml}$$

Az $\text{OD}_{260\text{nm}}$ és az $\text{OD}_{280\text{nm}}$ (a proteinek maximális abszorban-
ciája) közötti arány értékelésével megbecsülhető az RNS izolá-
lás tisztasága. Ennek az értéknek 1,6 és 1,8 között kell len-
nie.

3.2. mRNS izolálás Dynabeads Oligo (dT)₂₅ alkalmazásával

A Dynabeads Oligo (dT)₂₅ mRNA DIRECT kit az eukarióta mRNS poliadenozin nyúlvány RNS-ének olyan, szupermágneses, poli-
sztírol szemcsékhez történő hibridizációját alkalmazza, amely szupermágneses, polisztírol szemcsék a felületükhöz kovalensen



kötve a dezoyi-timidilát 25 nukleotid hosszúságú láncait tartalmazza. A mágneses gyöngyökhöz kötött mRNS-t egy Dynal mágneses részecske koncentrátor (Dynal MPC[®]) alkalmazásával szeparálhatjuk.

Mosó puffer: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; LiCl 0,15 mM;

EDTA 1 mM

2 × kötő puffer: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; LiCl 1 mM;

EDTA 2 mM

10 µg teljes RNS-hez 100 µl Dynabeads Oligo (dT)₂₅-öt választunk el a Dynal MPC[®] koncentrátorban, majd mosó pufferrel kétszer mossuk. Eközben a teljes RNS-t 1x mosó pufferrel 200 µl-re töltjük fel, majd 65 °C-on 4 percen keresztül inkubálva denaturáljuk. Ezt követően az RNS-t összekeverjük a gyöngyökkel, a keveréket 5 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd a Dynal MPC[®] koncentrátorban szeparáljuk. A gyöngyöket 1x mosó pufferrel kétszer mossuk. A poliadenilezett RNS-t kétszer 10 µl elúciós pufferrel 4 percen keresztül 65 °C-on inkubálva eluáljuk a Dynabeads Oligo (dT)₂₅-ről. A Dynabeads Oligo (dT)₂₅-öt a Dynal MPC[®] koncentrátorban szeparáljuk, majd a felülúszót azonnal áttöltjük egy új, RNáz-mentes centrifugacsőbe. Az eluátumot közvetlenül felhasználjuk a reverz transzkripcióhoz.

3.3. Reverz transzkripció

Az Epo specifikus primert 80 °C-on végzett 4 perces inkubálással denaturáljuk, az mRNS-t pedig 65 °C-on 5 percen keresztül végzett inkubálással denaturáljuk. Egy jégen tartott 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe a következő komponenseket mér-

jük be:

Reagens	Végkoncentráció
mRNS	10 µl
MMLV (200 E/µl)	0,25 µl
Boehringer PCR puffer (10 ×)	2 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
Epo for (100 pmol/µl)	1 µl
DTT (0,1 M)	0,25 µl
RNáz inhibitor (40 E/µl)	0,25 µl
H ₂ O	3,25 µl

Inkubálás: 60 perc 37 °C

Inaktiválás: 5 perc 100 °C

3.4. Polimeráz láncreakció

Egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe 4 °C-on a következő komponenseket mérjük be. A PCR körülményeket ezt követően soroljuk fel.

Reagens	Epo
templát	cDNS Epo 5 µl
polimeráz	Vent 1U (0,5 µl)
polimeráz puffer (10x)	Vent puffer 1x (10 µl)

Reagens	Epo
dNTPs (10 mM)	200 μ M (2 μ l)
MgCl ₂ (50 mM)	/
Primer for (10 pM)	30 pM (3 μ l)
Primer back (10 pM)	30 pM (3 μ l)
DMSO	/
H ₂ O	76,5 μ l

PCR ciklus		
1. denaturáció	95 °C	2 perc
2. denaturáció	94 °C	45 másodperc
3. primer temperálás (annealing)	58 °C	30 másodperc
4. kiterjesztés	72 °C	1 perc
5. kiterjesztés befejezése	72 °C	10 perc
6. ciklusszám	30	

A PCR amplifikáció termékeit agarózgél-elektroforézissel analizáljuk.

3.5. Agarózgél-elektroforézis

6 x BX puffer: brómfenolkék 0,25 %; xilol-xianol 0,25 %, glicerín 30 %

TAE puffer: Tris bázis 242 g; jégcet 57,1 ml; EDTA (0,5 M, pH 8,0) 100 ml; vízzel 1000 ml-re feltöltve



Lambda-Marker III: 10 µg Lambda-vad típus-Dann bakteriofág
[2,5 µl *Hind*III + 2,5 µl *Eci*RI + 20 µl R
puffer (Fermentas), vízzel 200 µl-re fel-
töltve;
37 °C-on 1 óra emésztés, 65 °C-on 20 perc
inaktiválás; 40 µl BX-töltő pufferrel ki-
egészítve]

1 g agarózt és 99 g 1xTAE puffert mikrohullámú kemencében megolvasztunk, körülbelül 60 °C-ra lehűtjük, majd kiegészítjük 3 µl 10 mg/ml koncentrációjú etidium-bromid törzsoldattal. A géleket 1xTAE pufferben, a szeparálandó DNS fragmentumok hosszától függően 100-300 V-nál körülbelül 30 percen keresztül futtatjuk. Minden egyes sáv egy 10 µl mintából és 2 µl 6 x BX pufferből álló keveréket tartalmaz. A DNS fragmentumokat a Lambda/*Hind*III molekulatömeg standardokkal végzett összehasonlítás alapján azonosítjuk.

3.6. Ligálásra alkalmas PCR termékek és vektorok előállítása

3.6.1. DNS vektor és inszert restrikció a tapadás (kohéziós, sticky) vég klónozáshoz

10 u restrikciós enzimet és megfelelő restrikciós puffert a gyártó utasításainak megfelelően összekeverünk 1 µg DNS vektorral és inszerttel. A keveréket az alkalmazott enzimektől, vektortól és inszerttől függően 30-60 percen keresztül 37 °C-on (*Sma*I esetén 30 °C-on) inkubáljuk. Ezt követően az enzimet 10 percen keresztül 65 °C-on végzett melegítéssel inaktiváljuk, majd a reakciókeveréket agarózgél-elektroforézissel analizáljuk.

3.6.2. Ligálás

pIRESneoSV40 vektor

A pIRESneo vektor (Clontech Laboratories) tartalmazza az encephalomyocarditis vírus (ECMV) IRES-ét (internal ribosome entry site), ami lehetővé teszi egyetlen messenger RNS-ből két ORF (open reading frame) transzlációját. A pIRESneo expresszió kazettája a következőket tartalmazza: a humán citomegalovírus (CMV) legerősebb promoter/enhancer (major immediate early, hCMV-MIE), ezt követően egy MCS (multiple cloning site), az ECMV IRES, majd a neomicin foszfortranszferáz gén és a bovin növekedési hormonnak a poliadenilezési szignálja. Ebben a vektorban a CMV promotert az SV40 korai promoter helyettesíti.

A vektort és PCR terméket T4 DNS ligázzal ligáljuk. Az optimális ligáláshoz körülbelül 20 ng vektort és (a hosszától függően) 200 ng inszertet alkalmazunk körülbelül 1:10 mól-arányban, amelyeket összesen 10 µl vízben összekeverünk az alábbi reagensekkel. Az inkubálást egy éjszakán keresztül 15 °C-on és 3 órán át szobahőmérsékleten végezzük. Ezt követően a ligált 10 perces 65 °C-on végzett inkubálással termikusan inaktiváljuk.

Reagens	Végső mennyiség
Vektor (pIRESneoSV40)	≈ 20 ng
Inszer (Epo)	≈ 200 ng
T4 DNA Ligase	1 E (1 µl)
Puffer (5x)	1x (2 µl)
H ₂ O	10 µl-re



3.6.3. Baktériumok és tenyésztőközeg

JM109 (Promega, USA)

LB-médium 10 g pepton kazeinből; 5 g élesztőextrakt; 10 g NaCl, vízzel 1000 ml-re töltve és a pH 5 M nátrium-hidroxid-oldattal 7,0-re beállítva

LB agar 15 g agar 1000 ml LB-médiumban

LB-Amp 100 µl (100 mg/ml) ampicillin 1000 ml LB-médiumban

SOC médium 20 g bakto tripton; 5 g élesztőextrakt; 10 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM glükóz; 10 mM MgSO₄

3.6.4. Transzformálás kalcium-klorid alkalmazásával

A kompetens baktériumok (JM109) előállítása

10 ml LB médiumot *E. coli*-val (JM109) inokulálunk, majd 37 °C-on egy éjszakán keresztül tenyésztést végzünk. 4 ml baktériumtenyészetet LB médiummal 1:100 arányban meghígítunk, majd 0,8-es OD_{260nm} érték eléréséig tenyésztést végzünk. A baktériumokat 4 °C-on 10 percen keresztül 4500 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, majd a sejttöledéket 4 °C-on 0,1 M kalcium-klorid-oldatban szuszpendáljuk (10 ml 0,1 M CaCl₂/50 ml baktériumszuszpenzió). A sejteket centrifugáljuk, az üledéket 2 ml 0,1 M kalcium-klorid-oldatban szuszpendáljuk, majd 100 µl-es részletekre osztjuk, cseppfolyós nitrogénben lefagyasztjuk és -80 °C-on tároljuk.

Transzformáció

Előre lehűtött 17 × 100 mm-es polipropilén tenyésztőcsövekben JM109 kompetens baktériumokhoz 5-10 ng plazmid DNS-t

adunk, a keveréket óvatosan összekeverjük, majd 30 percre jégre helyezzük. Ezt követően a sejteket egy pontosan 42 °C-ra beállított vízfürdőben rázás nélkül 45 másodpercen keresztül termikusan sokkoljuk, majd azonnal jégre helyezzük és 2 percen át a jégen tartjuk. Ezt követően 900 µl SOC médiumot mérünk be a csőbe, a csövet 30 percen keresztül 37 °C-on inkubáljuk, majd 100 µl baktériumszuszpenziót LB-Amp lemezekre helyezünk.

3.6.5. Szkrínelés és glicerinnel tenyésztés kialakítása

Ampicillin rezisztens kolóniákat PCR eljárással az inszerált DNS fragmentumra nézve szkrínélünk. Az ampicillin rezisztens kolóniák részleteit összekeverjük a PCR reakciókeverékkel és a klónozott DNS fragmentum (lásd alább) elleni specifikus primerekkel. A pozitív telepek PCR-amplifikált DNS sávokat mutatnak az agarózgél-elektroforézisben. Ezt követően ezeket a kolóniákat LB-Amp médiumban tovább szaporítjuk a további analízisekhez és plazmidtisztításhoz. A további felhasználáshoz és a tároláshoz a kívánt baktériumtenyészet 1 ml-ét összekeverjük 500 µl 87 %-os glicerinnel, majd a keveréket -80 °C-on tároljuk.

3.6.6. Wizard® Plus SV Minipreps DNS tisztítási rendszer

<i>Sejt reszuszpéndáló oldat</i>	Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM, RNáz A 100 µg/ml
<i>Sejtlízis oldat</i>	NaOH 0,2 M, SDS 1 %
<i>Neutralizáló oldat</i>	guanidin-hidroklorid 4,09 M, kálium-acetát 0,759 M; jégacet 2,12 M, pH 4,2
<i>Oszlopmosó oldat</i>	kálium-acetát 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0

mM, pH 7,5; etanol 60 %

2-3 ml LB-Amp médiumot egyetlen teleppel inokulálunk, majd egy éjszakán keresztül 37 °C-os inkubálást végzünk. Az oldatot 5 percen keresztül 12 000 × g értékkel centrifugáljuk, ezt követően az így nyert üledéket 250 µl reszuszpenziós oldatban reszuszpendáljuk, hozzáadunk 250 µl sejtlízis oldatot, a keveréket a csövek négyszeri felfordításával összekeverjük, majd a csöveket 1-5 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. Nek a csövekbe bemérünk 10 µl (5 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubált) alkálikus proteáz oldatot és 350 µl neutralizáló oldatot. A csövet négyszeri felfordítással azonnal összekeverjük, majd a bakteriális lizátumot szobahőmérsékleten 10 percen keresztül 12 000 × g értékkel centrifugáljuk. A tiszta lizátumot Spin Column oszlopokra visszük, ezt követően az oszlopot 5 percen keresztül 12 000 × g értékkel centrifugáljuk, majd 750 µl és 250 µl mosó oldattal kétszer mossuk. A DNS-t 100 µl nukleázmentes vízzel eluáljuk.

3.6.7. Plazmidok szekventálása

Az inszertált szekvenciákat specifikus primerekkel végzett IBL (Gerasdorf, Ausztria) és GenXpress (Maria Wörth, Ausztria) alkalmazásával szekventáljuk. Az Epo és az SV40 korai promoter amplifikálására, valamint a szekvencia-analízisre felhasználható oligonukleotid primereket az alábbiakban soroljuk fel.

Oligonukleotid primer	Szekvencia	
<i>SV40 korai promoter</i>		
SV40 korai ClaI for	5'-aga tcg atc aag ctt ttt gca aaa gcc tag-3'	13. SZ. SZEKV.
SV40 korai NruI back	5'-agt cgc gag cgc agc acc atg agcc tg-3'	14. SZ. SZEKV.
SV40 korai 281 back	5'-gcc cag ttc cgc cca ttc-3'	15. SZ. SZEKV.
<i>Epo</i>		
Epo BamHI for	5'-tag gat cct cat ctg tcc cct gtc ctg c-3'	16. SZ. SZEKV.
Epo EcoRI back	5'-tag aat tcc gcc atg ggg gtg cac gaa tgt cc-3'	17. SZ. SZEKV.
Epo 221 for	5'-taa ctt tgg tgt ctg gga-3'	18. SZ. SZEKV.
Epo 204 back	5'-tcc cag aca cca aag tt-3'	19. SZ. SZEKV.
<i>pIRESneo</i>		
pIRESneo 181 back	5'-tta ggg tta ggc gtt ttg cg-3'	20. SZ. SZEKV.
pIRESneo 1016 for	5'-act cac ccc aac agc cg-3'	21. SZ. SZEKV.
pIRESneo 2786 for	5'-ggcc aaa caa cag atg gct-3'	22. SZ. SZEKV.
pIRESneo 200 back	5'-tgg aaa gag tca aat ggc-3'	23. SZ. SZEKV.

Az SV40LTpoliA/IVS terminális szakaszát pSV2neo-ból PCR-

Oligo 2004-11: hosszúság: 42mer

5' Kspl: ccgcgg – t (= 1598. poz. pSV2neo-ban) ttgtgaaggaa..... 29. SZ. SZEKV.

5' *SacI/EcoRI*: gagctc gaattc – **g** (= 752. poz. pSV2neo-ban) atccagacatg.... 31. SZ. SZEKV.

4.3. A p3 vektor rész előállítás

4.4 A p5 plazmid hármass ligálása és izolálása

A p3 plazmid *NotI*/*SacI* vektor részét, a *KspI*/*NotI* Epo gént



és a *KspI/SacI* terminális szakasz SV40LTpoliA/IVS-t egyetlen ligálási reakcióban ligáljuk (Ligation Express, Clontech). A transzformánsokat 100 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon szelektáljuk.

A mindkét inszerált fragmentumot tartalmazó pozitív transzformánsokat olyan telephibridizációval szkrínéljük, amelyben jelzett próbaként a két, 2004-09/2004-10 és 2004-11/2004-12 amplifikált fragmentumot alkalmazzuk. Egy "midi" méretű plazmid előállításához (Qiagen) kiválasztjuk azt a tíz klónt, amelyek mindkét próbával pozitív hibridizációs szignált ad.

A *BamHI* enzim (1 darab 4723 bp fragmentum), az *EcoRI* enzim (2 darab, 2913, 1810 bp fragmentum) és a *PvuII* enzim (4 darab, 2513, 1204, 903, 103 bp fragmentum) alkalmazásával restrikciós analízist végzünk. A korrekt restrikciós fragmentumokat mutató két klónt kiválasztjuk és szekventálással ellenőrizzük. A pBluescript II SK+-ba klónozott teljes kazettát szekventáljuk, majd a kazetta szekvenciáját összehasonlítjuk a várt nukleotid szekvenciával. Minden egyes nukleotidot eredményesen igazoltunk. A plazmidokat p5 jelzéssel láttuk el.

5. A pEpo/neo felépítése

5.1. A pEpo/neo 12-1 felépítése

p5 plazmid DNS-t *BamHI* és *EcoRI* alkalmazásával emésztünk, majd az így nyert, az SV40promoter-Epogene-SC40terminator kazettáját reprezentáló 1792 bp fragmentumot gélen tisztítjuk. *BamHI* és *EcoRI* alkalmazásával p2-neo plazmidot is emésztünk,

majd a linearizált vektor gént gélen tisztítjuk. Ezenkívül a DNS-t alkálikus foszfatázzal defoszforilezzük, majd Amicon Micropure enzim-eltávolítóval tisztítjuk.

Mindkét fragmentumot, azaz a 4411 bp p2-neo vektort és a p5-ből származó 1792 p kazettát ligáljuk (Ligation Express, Clontech) és *E.coli* SURE-ba transzformáljuk. Különféle, 70 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon tenyésztett transzformánsokból plazmid DNS-t izolálunk, majd a plazmid DNS-t *Pvu*II, *Eco*RI és *Nco*I restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel analizáljuk.

Kiválasztjuk azt a klónt, ami a várt fragmentumokat (*Eco*RI: 6191 bp, *Nco*I: 4085, 1326 és 780 bp, *Pvu*II: 3273, 2130, 685 és 103 bp) mutatja; ezt a klónt pEpo/neo-12 jelzéssel látjuk el.

A további tisztításhoz a DNS-t *E.coli* SURE-ba (lásd fentebb) és egy egyetlen kolóniával (pEpo/neo-12-1) inokulált tenyészetből "Midi-prep" eljárással (Qiagen) előállított plazmid DNS-be retranszformáljuk. A következő enzimek alkalmazásával restrikciós analízist végzünk: *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Spe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Nar*I. Megtalálhatók a várt fragmentumok és méretek, ami igazolja, hogy a klón egy korrekt pEpo/neo klón.

5.2. A pEpo/neo végső felépítése

A pEpo/neo-12-1-ben lévő Epo gén upstream szakaszát a start ATG-től számított mínusz-3 pozíciónál megváltoztatjuk. Egy további A nukleotidot vezetünk be, amelynek eredményeként a start ATG-től számított mínusz-3 pozíciónál a purinbázis G

lesz. Egy ebben a helyzetben lévő purin javíthatja a gén expressziós szintjét. Ennek a célnak az érdekében az Epo gént egy adaptált 2004-09-a upstream primerrel reamplifikáljuk:

Oligo 2004-09-1: hosszúság: 46mer

5'- gggggcgccgcaatgggggthcacgaatgtcctgcctggctgtgg -3'

32. SZ. SZÉK.

A 2004-09-a és a 2004-10 primerek amplifikációs termékét *Pwo* polimeráz (Roche Diagnostics) alkalmazásával végzett PCR-rel, a fentiekben ismertetetteknek megfelelően állítjuk elő. Az így nyert 605 bp DNS-fragmentumot DNS-izolációs oszlopok alkalmazásával tisztítjuk, *KspI*-gyel és *NotI*-gyel feltárjuk, majd a kapott 593 bp DNS-fragmentumot gélen tisztítjuk.

Az Epo gén eltávolításához a pEpo/neo-12-1 plazmid DNS-t *KspI*-gyel és *NotI*-gyel emésztjük. Ezt követően az 5599 bp fragmentumot gélen tisztítjuk. Mindkét előállított DNS-t egymással ligáljuk (Ligation Express, Clontech). A transzformánsokból származó plazmid DNS-t 70 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon lévő kolóniákból izoláljuk és tisztítjuk. A DNS-eket egy első szkrínelésben *NcoI* alkalmazásával végzett restrikcióval analizáljuk.

A DNS izoláláshoz "Midi prep" eljárással (Qiagen) kiválasztunk egy pozitív klónt. *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *NcoI*, *NotI*, *PstI*, *SpeI*, *SphI*, *PvuII* és *NarI* alkalmazásával kiterjesztett restrikciós analízist végzünk. Megtalálhatók a várt fragmentumok és méretek, ami igazolja, hogy a klón egy korrekt pEpo/neo klón. A teljes kazettának (SV40korai_promoter - **neo gén** -

SV40LTpoliA/IVS - SC40korai_promoter - **Epo gén** - SC40LTpoliA/IVS) a pBR322 vektor részbe inszertált minden egyes nukleotidját szekventálással is igazoljuk.

2. példa

Az Epo/dhfr plazmid felépítése

1. A p2-dhfr-CDS felépítése

1.1. A dhfr gén előállítás

A vektro felépítéshez alkalmazott dhfr gént egy, a pLTRdhfr26 plazmidban (ATCC 37295) jelen lévő egér cDNS-ből vesszük. Az egér dhfr cDNS nukleotid szekvenciája (MUSDHFR) ismert (GenBank Accession No. L26316).

A dhfr-t a pLTRdhfr26-ból olyan primerekkel amplifikáljuk, amely primereket úgy terveztünk meg, hogy egy, a start ATG 56-os pozíciótól a TAA stop kodon 619-es helyzetéig terjedő kódoló szakaszt tartalmazó fragmentumot termeljenek. Az amplifikációt úgy hajtottuk végre, ahogyan azt a fentiekben a neomicin rezisztens gén amplifikálásánál ismertettük. Az amplifikációs primerek upstream-jébe *HindIII* helyet, downstream-jébe pedig *SpeI* helyet vezetünk be. A reverz primerbe a *SpeI* hely mellett egy *EcoRI* helyet is bevezetünk. Az oligonukleotidok szekvenciája a következő:

Oligo 2004-13: hosszúság: 39mer

5'- ggg gaa gct tat ggt tgc acc att gaa ctg cat cgt cgc -3'

33. SZ. SZEKV.

5' *HindIII*: aagctt - A (= 56. poz. MUSDHFR-ben) TGgttcgaccattg..... 34. SZ. SZEKV.

35. SZ. SZEKV.

tagctttcttctcgtagacttcaaact..... 36. SZ. SZEKV.

1.2. A p1-dhfr-CDS előállítás

A várt fragmentumokat mutató plazmid DNS-eket a konstrukciók releváns részeinek a szekventálásával tovább ellenőrizzük. Azt a plazmid DNS-t, amelyik egy igazolt SC40korai promotert és dihidrofolát-reduktáz gént tartalmaz, pl-dhfr-CDS jel-

zéssel látjuk el. A szekvenciák elemzése a *dhfr* génen belül feltárt egy eltérést a MUSDHFR publikált szekvenciájától, konkrétan a MUSDHFR szekvencia 451-es helyzeténél egy T → C cserét. A további szekventálás kimutatta, hogy ez a csere a forrás plazmidban is jelen van. Azonban ez a változás nem okoz változást a nukleotid szekvencia által kódolt aminosav szekvenciában, mivel a CTT és a CTC mindegyike leucint kódol.

1.3. A p2-dhfr-CDS előállítása

p1-dhfr-CDS plazmid DNS-t *EcoRI* + *SpeI* alkalmazásával emésztünk. Az így nyert linearizált fragmentumot tisztítjuk egy az SV40LtpoliA/IVS-t tartalmazó amplifikált fragmentummal (a fragmentum ismertetését lásd fentebb) ligáljuk. Transzformációt és szelekciót követően a kapott plazmidokat *AccI* alkalmazásával végzett restrikciós analízissel elemezzük (3 darab 2994, 855 és 216 bp fragmentum). Néhány fragmentumot kiválasztunk és tovább analizálunk *HincII* (2 darab 3466 bp és 599 bp fragmentum) és *BglI* (2 darab 2371 bp és 1694 bp fragmentum) alkalmazásával.

Azt a plazmid DNS-t, amelyik a várt fragmentumok mindegyikét a megfelelő méretben mutatja, szekventálással tovább ellenőrizzük. Az igazolt plazmidot p2-dhfr-CDS jelzéssel látjuk el.

2.1. A pEpo/dhfr 21 előállítása

p5 plazmid DNS-t *BamHI* és *EcoRI* alkalmazásával emésztünk, majd az így nyert, az SV40promoter-Epogene-SC40terminator kassetáját reprezentáló 1792 bp fragmentumot gélen tisztítjuk.

A p2-dhfr-CDS plazmidot *BamHI* és *EcoRI* alkalmazásával is



emésztjük, és a linearizált vektort gélen tisztítjuk és Supelco spin oszlopok alkalmazásával eluáljuk. Ezenkívül a DNS-t alkálikus foszfáttal defoszforilezzük, majd Amicon Micropure enzim-eltávolítóval tisztítjuk.

Mindkét fragmentumot, azaz a 4053 bp p2-dhfr-CDS vektort és a p5-ből származó 1792 p kazettát ligáljuk (Ligation Express, Clontech) és *E.coli* SURE-ba transzformáljuk. 70 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon tenyésztett transzformáns kolóniákat hibridizálunk, amelynek során próbaként Epo gént (PCR-termék) alkalmazunk. Különbféle pozitív klónokból plazmid DNS-t izolálunk, majd a plazmid DNS-t *Nco*I restrikciós endonukleáz alkalmazásával emésztjük.

Kiválasztjuk azt a klónt, amelyik a várt fragmentumokat (*Nco*I: 4085 bp és 1760 bp), és pEpo/dhfr-21 jelzéssel látjuk el. A további tisztításhoz a DNS-t *E.coli* SURE-ba (lásd fentebb) és egy egyetlen kolóniával (pEpo/dhfr-21-1) inokulált tenyészetből "Midi-prep" eljárással (Qiagen) előállított plazmid DNS-be retranszformáljuk.

A következő enzimek alkalmazásával restrikciós analízist végzünk: *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Spe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Nar*I. Valamennyi várt fragmentum és méret megtalálható, ami igazolja, hogy a klón egy korrekt pEpo/dhfr-21 klón.

2.2. A pEpo/dhfr végső felépítése

Ugyanolyan módon, mint a pEpo/neo esetében, az Epo/dhfr-21-ben lévő Epo gén upstream szakaszát a start ATG-től számított mínusz-3 pozíciónál megváltoztatjuk. Egy további A nukleotidot vezetünk be, amelynek eredményeként a start ATG-



tól számított mínusz-3 pozíciónál a purinbázis G lesz. Az Epo gént az 1. példa 4.2. szekciójában ismertetteknek megfelelően reamplifikáljuk.

Az Epo gén eltávolításához a pEpo/dhfr-21 plazmid DNS-t *KspI*-gyel és *NotI*-gyel emésztjük. Ezt követően az 5259 bp fragmentumot gélen tisztítjuk.

Mindkét előállított DNS-t egymással ligáljuk (Ligation Express, Clontech). A transzformánsokból származó plazmid DNS-t 70 mg/liter ampicillinnel kiegészített LB médiumon lévő kolóniákból izoláljuk és tisztítjuk. A DNS-eket egy első szkrínelésben *NcoI* alkalmazásával végzett restrikcióval analizáljuk.

A DNS izoláláshoz "Midi prep" eljárással (Qiagen) kiválasztunk egy pozitív klónt. *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *NcoI*, *NotI*, *PstI*, *SpeI*, *SphI*, *PvuII* és *NarI* alkalmazásával kiterjesztett restrikciós analízist végzünk. Megtalálhatók a várt fragmentumok és méretek, ami igazolja, hogy a klón egy korrekt pEpo/dhfr klón.

A teljes kazettának (SV40korai_promoter - **dhfr gén** - SV40LTpoliA/IVS - SC40korai_promoter - **Epo gén** - SC40LTpoliA/IVS) a pBR322 vektor részbe inszertált minden egyes nukleotidjét szekventálással is igazoljuk.

3. példa

pEpo/neo-ból és pEpo/dhfr-ből létrehozott rekombináns

CHO-sejtek

A lipofektin transzfekció előtt egy nappal 25 cm²-es lom-



bikokban (T-flask) vagy 96-vájatú lemezeken $1-5 \times 10^4$ sejt/cm² sűrűséggel leoltjuk a sejteket. A két plazmidot 50:1 = Epo/neo:Epo/dhfr arányban összekeverjük, majd a gyártó előírásait betartva a lipofektin reagenshez (GIBCO/BRL) adszorbeáljuk.

Ennek során 0,25 µg DNS/cm² és 1,5 µl lipofektin-reagens/cm² mennyiségeket alkalmaztunk, és ezt a DNS/lipid koktélt 200 µl/cm² sejtréteg értékre állítottuk be. Ezt követően a sejteket szérummentes DMEM-ben befedtük a transzfekciós koktéllal, majd négy órával később a DNS-tartalmú médiumot tenyésztőközegrre cseréltük. A szérumtartalmú médiumban végzett 24 órás tenyésztést követően a médiumot kicseréltük a szelekciós közegre. A transzfektált sejteket először a szelekciós közegben konfluenssé válásig, ezt követően az amplifikációs közegben ($4,8 \times 10^{-8}$ M MTX) tenyésztjük, majd a sejttenyészet-felúszókat ELISA alkalmazásával az Epo termelésre nézve szkríneljük. Meghatározzuk a legnagyobb termelőket, az MTX koncentrációt a kétszeresére növeljük, majd a legjobb termelőket további tenyésztésre használtuk. Kiválasztunk 7 rekombináns sejtközösséget, és összehasonlítjuk a növekedési tulajdonságokat, az Epo produktivitást, (western blot analízissel) a protein jellemzőket, az Epo funkcionalitást és a kromoszomális stabilitást.

A T25-edényben végzett transzfekciót T25-edényenként 2,5 µg pEpo/neo, 0,05 µg pEpo/dhfr és 15 µl lipofektin (09/T25/1 és 09/T25/2), valamint T25-edényenként 2 µg pEpo/neo, 0,4 µg pEpo/dhfr és 15 µl lipofektin (09/T25/3 és 09/T25/4) alkalmazá-



sával hajtjuk végre.

További öt lemez mindegyikét lemezenként 10 μg pEpo/neo, 0,2 μg pEpo/dhfr és 60 μl lipofektin (09/96/1 - 09/96/5) alkalmazásával transzfektálunk, öt lemezt pedig lemezenként 8 μg pEpo/neo, 1,6 μg pEpo/dhfr és 60 μl lipofektin (09/96/6 - 09/96/10) alkalmazásával transzfektálunk. A 11. és a 12. lemezt lemezenként 6,25 μg pEpo/neo, 0,08 μg pEpo/dhfr és 37,5 μl lipofektin alkalmazásával transzfektáljuk.

0,25 μg DNS/ cm^2 és 1,5 μl lipofektin-reagens/ cm^2 mennyiségeket alkalmazunk, és ezt a DNS/lipid koktélt 200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ sejtréteg értékre állítjuk be.

A transzfekciók sorozatát elsősorban mikrotiterlemezeken végezzük, mivel a korábbi kísérletek azt mutatják, hogy egyetlen tenyészetegységben a klónok száma legfeljebb 3-5. Ily módon egy monoklonális transzfektáns könnyebben izolálható, mint ha a T-lombikban lévő több száz klónból kell az izolálást elvégezni.

Az 1. táblázatban ismertetjük a 96-vájtú lemezenkénti klónszámot, valamint az ELISA titereket (adott esetben az amplifikációs hatással). A transzfektált sejteket először a szelekciós közegben konfluenssé válásig, ezt követően az amplifikációs közegben ($4,8 \times 10^{-8}$ M MTX) tenyésztjük, majd a sejtenyészet-felülúszókat ELISA alkalmazásával az Epo termelésre nézve szkríneljük. Hozzávetőleg 1000 tenyésztővájatot szkrínelünk, és 50 ilyen tenyészetet megnövelt MTX koncentráció mellett a specifikus Epo-produktivitásra nézve is tesztelünk. Meghatározzuk a legnagyobb termelőket, az MTX koncentrációt a

kétszeresére növeljük, majd a legjobb termelőket további tenyésztésre használtuk.

A szelekciót és az első amplifikációs lépéseket a 96-vájatú lemezben hajtjuk végre, majd a $4,8 \times 10^{-8}$ M MTX koncentráció mellett tenyésztett valamennyi klón szkrínelése után 7 klont szelektálunk, amelyeket 09/96/1F5, 09/96/3D5, 09/96/3H5, 09/96/5D4, 09/96/5H1, 09/96/6C5 és 09/96/7E6 jelzéssel látunk el, majd összehasonlítjuk a növekedési tulajdonságokat, az Epo produktivitást, (western blot analízissel) a protein jellemzőket, az Epo funkcionális teszteket és a kromoszomális stabilitást.

A sejtkettőződés ideje ugyanolyannak látszik valamennyi klón esetén. A klónok hetente kétszer 1:2-1:5 arányban oszthatók fel. A MTX koncentrációnak a $9,6 \times 10^{-8}$ M-ről $1,9 \times 10^{-7}$ M-ra történő növelése is javítja a termelékenységet, míg az MTX koncentráció további megkétszerezése nem befolyásolja az ELISA értéket. Az utóbbi esetben $3,8 \times 10^{-7}$ M MTX koncentrációnál végzünk szubklónozást. Az immunofluoreszcenciát $1,9 \times 10^{-7}$ M MTX koncentrációnál analizáljuk, ahol az egyedi tenyészetek nem mutatnak szignifikáns eltérést.

A sejtmorfológiát fénymikroszkóppal és Coulter Counter nukleusz DNS analízissel hasonlítjuk össze. A 09/96/7E9, a 09/96/6C5, a 09/96/5H1, a 09/96/5D4 és a 09/96/3D5 klón ugyanolyan nukleuszméret-eloszlást mutat, mint a CHO-dhfr gazdasejtvonal. Ezzel szemben a 09/96/1F5 és a 09/96/3H5 sejtvonal nagyobb nukleuszokkal rendelkezik. A korábbi kísérletekből ismert, hogy ezt a kromoszómák megnövekedett száma eredményezi.

Ezért döntöttük úgy, hogy a további stabilizáláshoz a 09/963D5 klónt alkalmazzuk.

Az Epo-nak a TF-1 sejteken végzett funkcionális tesztje mind a hét tenyészet-felülúszó esetén ugyanolyan eredményt ad, mint a rekombináns gyógyszerészeti termék.

A rekombináns proteint minden egyes MTX koncentrációnál SDS PAGE és western blotting alkalmazásával teszteljük, és csak kisebb változásokat észlelünk a rekombináns tenyészet-felülúszók között. A klónok Epo-t termelnek.

Összefoglalás és diszkusszió

Egy rekombináns, Epo-t expresszáló CHO-sejtvonalnak eukarióta expressziós vektorokból történő szelekcióját, emlős sejtek transzfektálását és poliklonális Epo-expresszáló sejtcsoportok izolálását ismertetjük. Az analíziseket ELISA, immunofluoreszcencia, western blotting és *in vitro* funkcionális tesztek alapján végezzük. Az eljárások mindegyike alkalmas olyan koncentráció-tartományokban történő mérésre, amelyekkel még az alacsony termelékenységű, csak ng/ml mennyiségeket tartalmazó felülúszókkal rendelkező sejtcsoportok, valamint a további stabilizált rekombináns sejtek is szkrínélhetők.

Egy rekombináns CHO-csoportot generálunk, amelyben a génmásolatszámot legfeljebb $3,8 \times 10^{-7}$ MTX koncentrációnál lépésenként amplifikáljuk. Ezeket a sejteket hetente kétszer 1:3-1:4 arányban feloszthatjuk, és minden egyes alkalommal fokozott Epo mennyiségeket detektálunk az ELISA-ban.



4. példa

Egy rekombináns sejtvonal további szelekciója

A 09/96/3D5 rekombináns sejtcsoportot alkalmazzuk további stabilizálásra. Az MTX koncentrációt lépésenként $0,38 \mu\text{M}$ MZX értékre növeljük. Ennél az amplifikációs szintnél rekombináns 3D5 sejteket 10 és 20 sejt/vájat érték mellett szubklónozzunk. Az egyedi klónokat tartalmazó vájakat tenyészet-felülűszóinak a szkrínelését ELISA alkalmazásával végezzük. A 2. táblázatban bemutatjuk a szubklónozási körülményeket, valamint a 3D5 rekombináns sejtcsoportnak a $0,38 \mu\text{M}$ MTX jelenlétében mutatott hatékonyságát. A négy nappal az átoltás után fokozott Epo titerrel rendelkező klónokat 24 vájatú lemezekre $0,77 \mu\text{M}$ MTX-szel szelektáljuk.

Ezek közül a klónok közül hetet cseppfolyós nitrogénben konzerválunk. Ezeket a klónokat használjuk fel a génmásolat-számnak a legfeljebb $1,54 \mu\text{M}$ -ig növelt MTX koncentrációval végzett további amplifikálására.

A 3. táblázat ismerteti a lemezekkel kapcsolatos körülményeket és a stabilizáció második fordulójának a hatékonyságát. Végül a 09/96/3D5/1H9 és a 09/96/3D5/18E5 klónokat szubklónozzuk $1,54 \mu\text{M}$ MTX koncentrációval. A vájatonkénti sejtszám 4 sejtre csökken. 260 egyedi klónt szkrínelünk, amelyek közül minden egyes szubkultúra több mint 20 klónját T-lombikokba helyezünk és a fajlagos termelékenységre nézve szkríneljük. A végső termelési klónokat olyan kritériumok alapján csoportosítjuk, amilyen a specifikus expressziós sebesség, a növekedési körülmények és a nukleusz méreteloszlás. A tetraploiditást

mutató klónokat elhagyjuk, mivel a kísérletek azt mutatják, hogy ezek a sejtek a bioreaktorokban gyakran komplikált növekedési jellemzőket mutatnak. Szkrínelés után az alábbi hat szubklónt (négy 1H9 és két 18E5 szubklónt) választjuk ki, amelyeket folyékony nitrogénben lefagyasztunk.

09/96/3D5/1H9/4C2	09/96/3D5/1H9/6C2	09/96/3D5/1H9/6D4
09/96/3D5/1H9/15B4	09/96/3D5/18E5/7A6	09/96/3D5/18E5/15C3

5. példa

Szérummentes tenyésztőközegre történő adaptálás

A 4. példa szerinti végső hat rekombináns sejtnonalat választjuk ki az utolsó szubklónozási lépést követő szérummentes tenyésztési körülményekre történő adaptáláshoz.

A szubklónozás után 7-12. passzázsban lévő sejteket körülbelül 5×10^4 sejt/cm² mennyiségben T25-lombikokba oltjuk, majd a sejteket 3-4 nap alatt konfluenssé válásig tenyésztjük. Ennél a pontnál a teljes médiumot lecsréljük szérummentes adaptációs médiumra, és a továbbiakban a közeg 80 %-át naponta megújítjuk. Valamennyi szuszpendált sejtet visszavezetjük a tenyészetbe. Az adaptációs idő után, amikor csaknem az összes sejt szuszpenzióban növekedett, a klónokat hetente kétszer átoltjuk és szuszpenziós tenyészet formájában tenyésztjük.

A krioprezerválás (fagyasztásos konzerválás) előtt a klónokat szérummentes adaptációs médiumban 11-13 átoltáson (passzázs) keresztül tenyésztjük. Hat ampullában szérummentes

fagyasztó médiumban minden egyes sejtvonalból 5×10^6 sejtet cseppfolyós nitrogénben lefagyasztunk. Felolvasztás után a klónokat szérumentes termelő médiumban tenyésztjük. A termelő klónok kiválasztásához az analitikai vizsgálatokat a felolvasztás utáni második vagy harmadik passzázsban lévő felülúszókban hajtjuk végre.

Az analitikai tesztek a következő paraméterekre, illetve vizsgálatokra terjednek ki:

fajlagos (specifikus) növekedési sebesség [μ]

$$[\mu = (X_2/X_1) / \text{napok száma}]$$

fajlagos (specifikus) termelékenység (produktivitás) [Q_p]

$$[Q_p = \text{termékképződés} \times 10^6 / (\text{sejtszám} \times \text{napok száma})]$$

western blot

izoelektromos fókuszálás

DNS-tartalom és DNS-stabilitás

klónstabilitás

Mind a hat sejtvonal tenyésztethető szérumentes tenyésztő médiumokban; hetente kétszer hajtunk végre felosztást. Szérum nélkül is végzünk krioprezervációt, és felolvasztás után a tenyésztő közeget szérumentes termelő médiumra cseréljük. A szérumentes termelő médium glükózt és aminosavakat fokozott mennyiségben tartalmaz.

Öt átoltás (passzázs) után meghatározunk különféle protein és celluláris paramétereket, amelyek alapján egy termelő (produktív) klónt (09/96/3D5/1H9/6C2; röviden: 6C2) és egy back up klónt (09/96/3D5/1H9/4C2; röviden: 4C2) választunk ki.

6. példa

A rekombináns sejtvonalak összehasonlítása

A 4. és 5. példából származó hat sejtvonal növekedési tulajdonságait több hét után, a tenyészetben lévő sejtek számának a meghatározásával és az átoltás ideje alatti felosztási arány alapján számítjuk ki. Az Epo termelékenységet (produktivitást) ELISA alkalmazásával teszteljük. Ezekből az adatokból kiszámítjuk a fentiekben meghatározott fajlagos termelékenységet és fajlagos növekedési sebességet.

A 4. táblázat azokat az adatokat összegzi, amelyeket háromnapos tenyésztés után, 1:3 arányú felosztás mellett, standard tenyésztési körülmények alkalmazása esetén nyertünk.

A felosztás utáni és a további három nappal későbbi sejtszámok láthatók (a sejtszámokat Coulter Counter alkalmazásával mértük).

SDS-PAGE redukáló körülmények között

SDS-PAGE alkalmazásával elválasztjuk a hat sejtvonal felülúszóit, majd összehasonlítjuk a molekulatömegek eltéréseit. A hat felülúszó azonos SDS képeket mutat, kevés, a nagymértékben glikozilezett proteinekben gyakran látható szennyeződéssel (az adatok nem láthatók).

Az összehasonlítható kereskedelmi termék egy nagyobb mértékben eltérő sávként mozog, feltehetően az eltérő sávoknak az eljárás későbbi fázisaiban történő elválása miatt.

IEF-western blot

Az IEF-western blot analízis kimutatja a glikoproteinek potenciális mikroheterogenitásait. A géltre felvitt protein

menyiségének megfelelően 14 sáv válik láthatóvá. Körülbelül a gél közepén egy karakterisztikus kettős sáv látható a western blot-on; az ez alatti kettős sáv alatti következő sávot 1. számú sávként definiáljuk, és 9-10 sáv látható a gélnek ebben a savas részében. Az összehasonlítható kereskedelmi termék négy fő sávot adott, amelyek a heterogén termékben lévő 6., 7., 8. és 9. számú sávnak felelnek meg.

A rekombináns sejtek DNS-tartalma

A DNS-tartalom a sejtvonalak kromoszómáinak a számaival arányos. Egy rekombináns sejtvonal stabilitását részben befolyásolja a kromoszómaszám. A DNS-tartalom azonosságát a gazda-sejtvonallal (CHO-dhfr) végzett összehasonlítással igazoltuk.

Összefoglalás és diszkusszió

A kereskedelmi tisztított proteinhez képest a rekombináns tenyészet-felülúszók western blot képe számos további kis molekulatömegű sávot mutat. Ennek egyik magyarázata az, hogy ezek a további sávok olyan izoformákat képviselnek, amelyek az eljárásnak a kereskedelmi termékhez vezető későbbi részében eltávolításra kerülnek. Egy másik lehetőség az, hogy a nem tökéletes SDS felvétel miatt mesterséges sávokat detektálunk. Az izoelektromos fókuszálás valamennyi sejttenyészet-felülúszó esetén azonos izoforma-eloszlást ad, függetlenül a sejttenyészet-felülúszók Q_p értékeitől.

A legjobb termelő kód és a legkönnyebben kezelhető klón a 6C2 klón; ezt választjuk ki termelési klónként. Back-up klónként a 4C2 klón választjuk. Mindkét klón forgó edényben (roller bottle) szaporítható.

7. példa

CHO-sejtek tenyésztése T-lombikokban (T-flask)

T-lombikokban (T-flasks) szérummentes körülmények között rekombináns humán eritropoetint termelünk egy CHO (Chinese hamster ovary) sejtvonalban. A tenyészetet $2,67 \times 10^5$ sejt/ml sejtsűrűséggel oltjuk be. Egy háromnapos inkubációs periódus után $9,35 \times 10^5$ sejt/ml végső sejtsűrűséget érünk el ($\rightarrow \mu = 0,42 \text{ nap}^{-1}$).

Az 1-6. példa számos olyan CHO klón előállítását ismerteti, amely klónok Epo-t expresszálnak. Rendkívül nagy sejtspecifikus termelékenysége és nagy fajlagos növekedési sebessége miatt a 4. és 5. példában nyert hat klón közül a CHO 6C2 klónt választjuk ki.

8. példa

CHO-sejtek tenyésztése egy bioreaktorban

A 6C2 CHO-sejtvonalat egy 150 literes bioreaktorban rátáplálásos szakaszos (Fed-Batch) üzemmódban (T43C6C2) tenyésztünk. Egy aminosavval kiegészített és 0,25 % növényi peptidet, 0,1 % lutrolt, 1,54 μM metotrexátot (MTX), 4 g/liter glükózt, 2,5 g/liter nátrium-hidrogén-karbonátot, etanol-amint, vas-(III)-citrátot, aszkorbinsavat és nátrium-szelenitet tartalmazó 50:50 arányú DMEM/Hans F12 keveréket alkalmazunk sejtenyésztő médiumként. A médium nem tartalmaz semmilyen költséges funkcionális proteint (rekombináns vagy természetes forrásból származó funkcionális proteint). Állati eredetű komponensek jelen vannak. A sejteket 56 liter médiumban körülbelül 5×10^5

sejt/ml sejtsűrűséggel oltjuk le. A pO_2 értéket 50 %-os levegő szaturációra, a hőmérsékletet 37 °C-ra, valamint a pH-t 7,0-re állítjuk be, és a fermentáció egész ideje alatt valamennyi említett paramétert a megadott értéken tartjuk.

A glükózkonzentrációt 1 g/liter felett tartjuk. Négy nap elteltével a reaktort friss médiummal 150 literre töltjük fel. Kilenc nap után aminosavakat, egy szénhidrátot és egy növényi eredetű peptont tartalmazó tápanyag-koncentrátum hozzáadásával (1875 ml) kiegészítjük a sarzsot. Tíz nap után további 1875 ml tápanyag-koncentrátumot adunk a sarzshoz. Két nappal később (12. nap) az eritropoetint tartalmazó felülúszót kinyerjük.

9. példa

Eritropoetin-termelés egy bioreaktorban metotrexát nélkül

A 6C2 CHO-sejtvonalat 5 literes bioreaktorokban rátáplálásos szakaszos (Fed-Batch) üzemmódban (Kamp 4 B5-1 és 2) tenyésztünk. A sejttenyésztő médium azonos a 8. példában ismertetett közeggel. Az első bioreaktorban (Kamp 4 B5-a) a médium 1,54 μM MTX-et tartalmaz, míg a második bioreaktorban (Kamp 4 B5-2) a médium nem tartalmaz MTX-et.

A glükózkonzentrációt 1 g/liter felett tartjuk. A sejteket 56 liter médiumban körülbelül 5×10^5 sejt/ml sejtsűrűséggel oltjuk le. A pO_2 értéket 50 %-os levegő szaturációra, a hőmérsékletet 37 °C-ra, valamint a pH-t 7,0-re állítjuk be, és a fermentáció egész ideje alatt valamennyi említett paramétert a megadott értéken tartjuk. Két nap elteltével a reaktort friss médiummal 5 literre töltjük fel. A 6., 7., 8., 9. és 10. nap

után aminosavakat, egy szénhidrátot és egy növényi eredetű peptont tartalmazó tápanyag-koncentrátum hozzáadásával (50-122 ml) kiegészítjük a sarzsot. A 11. napon kinyerjük az eritropoetint tartalmazó felülúszót.

A jobb glikozilezési jellemzők miatt a metotrexát nélküli tenyésztés rendkívül jónak bizonyult.

10. példa

Eritropoetin-termelés egy bioreaktorban dúsított médiummal

A 6C2 CHO-sejtvonalat 5 literes bioreaktorokban rátáplálásos szakaszos (Fed-Batch) üzemmódban (Kamp 11 B5-1 és 2) tenyésztünk. Az 1. bioreaktor ugyanúgy üzemel, mint a 10. példában (Kamp 4 B5-2). A 2. bioreaktorban egy dúsított aminosavkiegészítésű és 0,325 % növényi peptidet, 0,1 % lutrolt, 6,4 g/liter glükózt, 2,5 g/liter nátrium-hidrogén-karbonátot, etanol-amint, vas(III)-citrátot, aszkorbinsavat és nátrium-szelenitet, valamint 0,6 g/liter foszfátot tartalmazó 50:50 arányú DMEM/Hans F12 keveréket alkalmazunk sejttenyésztő médiumként. A sejteket 1250 ml médiumban körülbelül 5×10^5 sejt/ml sejtsűrűséggel oltjuk le. A pO_2 értéket 50 %-os levegő szaturációra, a hőmérsékletet pedig 37 °C-ra állítjuk be. A pH-t az indulásnál 7,1-re állítjuk be. A fermentáció lejátszódásának az ideje alatt a 7,1-es pH-értéket lépésenként 6,9-re csökkentjük.

A tenyésztés ideje alatt a 2. bioreaktorban a glükózkoncentrációt 3 g/liter és 4 g/liter közötti értéken tartjuk. 2,5 nap elteltével a reaktort friss médiummal 5 literre töltjük

fel. A 6., 7., 8., 9. és 10. nap után aminosavakat, egy szénhidrátot és egy növényi eredetű peptont tartalmazó dúsított tápanyag-koncentrátum hozzáadásával kiegészítjük a sarzsot. A 11. napon kinyerjük az eritropoetint tartalmazó felülúszót.

Azt tapasztaltuk, hogy a tápanyagban dúsított médiummal (aminosav, glükóz, növényi pepton és foszfát), valamint a 7,1 → 6,9 pH-eltolással végzett tenyésztés több mint kétszeresére növelte a végső Epo-koncentrációt, egy összehasonlítható glikozilezési profil mellett.

11. példa

Eritropoetin-termelés egy bioreaktorban állati eredetű komponensek nélkül

A 6C2 CHO-sejtvonalat 5 literes bioreaktorokban rátáplálásos szakaszos (Fed-Batch) üzemmódban (Kamp 17 B5-1 és 3) tenyésztünk. Amennyiben másképpen nem jelezzük, valamennyi paraméter megegyezik a 10. példában ismerttetettekkel. A 2. bioreaktorban egy olyan sejttenyésztő médiumot alkalmazunk, amely nem tartalmaz semmiféle állati eredetű komponenst. Például az olyan aminosavak, amilyen a tirozin és a cisztein, jellegzetesen állati eredetűek (például lazacból vagy humán hajból származnak); ezeket az aminosavakat szintetikus aminosavakkal helyettesítettük.

2,5 nap elteltével a reaktort friss médiummal 5 literre töltjük fel. Az 5., 6., 7., 8. és 9. nap után aminosavakat, egy szénhidrátot és egy növényi eredetű peptont tartalmazó tápanyag-koncentrátum hozzáadásával kiegészítjük a sarzsot. A

9-10. napon kinyerjük az eritropoetint tartalmazó felülúszót.

Az állati eredetű komponenseket nem tartalmazó médiumok összehasonlítható végső Epo-koncentrációt eredményeznek. Azonban a tenyészet növekedése lassabb és további tápanyag-koncentrációt hozzáadását igényli.

12. példa

Eritropoetin-termelés egy bioreaktorban dúsított médiummal **(vitaminok, nyomelemek)**

A 6C2 CHO-sejtvonalat 10 literes bioreaktorokban rátáplálásos szakaszos (Fed-Batch) üzemmódban (Kamp 12 C) tenyésztünk. A bioreaktor ugyanúgy üzemel, mint a 11. példában (Kamp 11 B5-2), a következő eltérésekkel.

A bioreaktorban egy dúsított aminosav-kiegészítésű és 0,325 % növényi peptidet, 0,1 % lutrolt, 6,4 g/liter glükózt, 2,5 g/liter nátrium-hidrogén-karbonátot, etanol-amint, vas-(III)-citrátot, vitaminokat, nyomelemeket és nátrium-szelenitet, valamint 0,6 g/liter foszfátot tartalmazó 50:50 arányú DMEM/Hans F12 keveréket alkalmazunk sejttenyésztő médiumként. A koncentrációt tartalmát megduplázzuk és vitaminokkal dúsítjuk.

A sejteket 4500 ml médiumban körülbelül 5×10^5 sejt/ml sejtsűrűséggel oltjuk le. A pO_2 értéket 50 %-os levegő szaturációra, a hőmérsékletet pedig 37 °C-ra állítjuk be. A pH-t az indulásnál 7,1-re állítjuk be. A fermentáció lejátszódásának az ideje alatt a 7,1-es pH-értéket lépésenként 6,9-re csökkentjük.



A tenyésztés ideje alatt a biorektorban a glükózkonzentrációt 3 g/liter és 4 g/liter közötti értéken tartjuk. Három nap elteltével a reaktort friss médiummal 10 literre töltjük fel. A 6., 7., 8., 9., 10., 11. és 12. nap után dúsított tápanyag-koncentrátum hozzáadásával kiegészítjük a sarzsot. A 13. napon kinyerjük az eritropoetint tartalmazó felülúszót.

13. példa

Epo izolálás

Sejtszeparálás

Egy CHO (Chinese hamster ovary) sejtvonalban, szérummentes körülmények között végzett rátáplálásos szakaszos fermentációval rekombináns humán eritropoetint termelünk. A fermentáció után (2 eltérő reaktorban négyszer körülbelül 1+2 sarzs expanzíós fázis) a kinyert, literenként 200-300 mg rhEpo-t tartalmazó fermentlét 2-8 °C-ra hűtjük és közbeiktatott tárolási idő nélkül először centrifugálással (disc stack szeparátor), majd mélyszűréssel (PP Polygard 0,1 μm , Seitz Bio10 vagy Cuno A90M08, átmenő kapacitás: körülbelül 300 liter/m² szűrőfelület) és 0,2 μm -es szűréssel (Sartobran P, Sartorius vagy Duropore 0,22 μm , Millipore) tisztítjuk. Annak érdekében, hogy elkerüljük a nagymértékű sejtlízist és ebből következően a termék nagy mennyiségű HCP-vel (gazdasejt-proteinnel) történő szennyezését, igen fontos, hogy 1.) a kinyerést (harvest) egy optimális időpontban (körülbelül 12 nap a fő tenyészetben, stagnáló oxigénfogyasztás) végezzük el, és 2.) olyan, kifejezetten törékeny eukarióta sejtek szeparálására tervezett sejtszepa-

ráló eszközt használjunk, amilyen például a hidrohermetikus betáplálás-bevezetővel rendelkező CSC6 (6000 m² ECA, 15 500 × g, körülbelül 200 liter/óra, Westfalia) vagy a gyenge tárcsás bevezetővel és szögeshengeres (porcupine) kivezetővel rendelkező BTPX 250 (11 000 m² ECA, 13 000 × g, 300 liter/óra, Alfa Laval). A különböző szeparációs módszerek, köztük a tangenciális áramlásos szűrés és a centrifugálás összehasonlítása kimutatta, hogy a nyírófeszültség által okozott sejtlízisben eltérések vannak (a sejtlízist az LDH intracelluláris marker enim felszabadulásával mértük). A centrifugálás biztosítja a legkíméletesebb szeparálást (< 3 E LDH/mg rhEpo), ezért ezt tekintjük az előnyös szeparálási módszernek.

Egy alternatív megoldás értelmében a sejtszeparációs lépésben a fentiekben ismertetett tárcsás centrifugálást hajtjuk végre (a mélyszűrési lépés nélkül). Egy további megoldásban csak a mélyszűrési lépést hajtjuk végre (a centrifugálási lépés nélkül).

Anioncserés (AEX) kromatográfiás befogás

Tisztítás (clarification) után a nyers felulúszót vízzel körülbelül háromszoros térfogatra hígítva legfeljebb 5 ms/cm végső vezetőképességet érünk el, és a pH-t Tris bázissal 7,5-re állítjuk be, majd a keveréket az AEX-befogó gyantára visszük.

Az alkalmazott AEX-oszlop ágya körülbelül 10-20 cm magaságú. Az oszlop jó folyási jellemzőkkel rendelkező Q Ceramic HyperD F (Biosphera) töltetű. Az oszlopot 20 mM Tris pH 7,5 és 50 mM NaCl alkalmazásával ekvilibráljuk. Ezt követően a hígí-



tott sejtfelülúszót 4-8- cm/perc áramlási sebességgel az oszlopra töltjük (10-15 mg rhEpo/ml gyanta), majd az oszlopot 10 oszloptérfogatnyi (column volume, CV) ekvibrációs pufferrel mossuk. A terméket lépcsőzetes elúcióval úgy eluáljuk, hogy az ekvibrációs puffert egy nagyobb vezetőképességű pufferre (150 mM NaCl-ot tartalmazó 20 mM Tris pH 7,5) cseréljük. A csúcsfrakciókat egyesítjük, amelynek eredményeként körülbelül 50-60 %-os kihozataalt érünk el.

Egy alternatív megoldás értelmében az egyesített frakciókat az intermedier térfogat csökkentése és a következő precipitációs körülmények standardizálása érdekében ultrafiltrálással betöményítjük. Előnyösen egy 5-10 kDa kivágású (cut-off) membránt alkalmazunk, és körülbelül 20 mg/ml termékkoncentrációt állítunk be.

Ammónium-szulfátos kicsapás

Az előző lépésben nyert anyagot jellemzően tovább tisztítjuk úgy, hogy 2,4 M ammónium-szulfáttal [AS; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] kicsapjuk a szennyező gazdasejtproteineket (host cell proteins; HCP). Ennél az AS koncentrációnál gyakorlatilag nincs termék a csapadékban. Az így nyert tiszta, HCP-mentes felülúszót a következő, 240 mM-nál kisebb ammónium-szulfát koncentrációval végzett, fordított (reverz) fázisú kromatográfiás tisztítás előtt meg kell hígítani.

A precipitálást (kicsapást) úgy hajtjuk végre, hogy egy térfogatrész befogott oldathoz 1,5 térfogatrész ammónium-szulfát törzsoldatot [4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris pH 7,5] adunk, 10-15 °C-on 30 percen keresztül inkubáljuk a keveréket, majd a

csapadékot mélyszűréssel (Seitz Bio10 vagy Cuno A90M08) és 0,2 μm -es szűréssel (Sartobran P, Sartorius vagy Duropore 0,22 μm , Millipore) szeparáljuk. Nagy elúciós térfogat [= híg rhEpo elúciós oldat (< 5 mg rhEpo/ml)] esetén a HCP precipitációt egy adott esetben elvégzendő UF-betöményítési lépéssel (10 kDa cut-off) javíthatjuk.

Az ammónium-szulfátos kicsapás hatékonyabb, mint a hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia.

Annak érdekében, hogy csökkentsük az előző precipitációs lépésből származó ammónium-szulfát-tartalmat, a terméket tartalmazó felülúszót a fentieknek megfelelően meg kell hígítani. Egy alternatív megoldás értelmében ultrafiltrálást/diafiltrálást végzünk. Előnyösen egy 5-10 kDa kivágású (cut-off) membránt alkalmazunk, az elérendő ammónium-szulfát koncentráció 240 mM-nál kisebb, és körülbelül 30 mg/ml termékkoncentrációt állítunk be. A diafiltrálási lépéshez alkalmazott puffer 20 mM Tris/HCl pH 7,0.

Fordított (reverz) fázisú kromatográfia

A következő tisztítási lépés egy fordított fázisú kromatográfia, ami több szempontból is hasznos: a) az eltérő izoformák a cukorvázaiknak megfelelően jól elválnak (a nagymértékben glikozilezett/szialilezett formák a kevésbé glikozilezett/szialilezett formák előtt eluálódnak); b) a nagyteljesítményű kromatográfia eltávolítja a maradék gazdasejtproteineket; és c) a kromatográfia a szerves oldószer révén erőteljes lépést jelent a vírusok eltávolításhoz, valamint a vírusok inaktiválásához. A 30RPC (Amersham Biosciences) egy polimer

gyanta, ami a) közepes nyomás (< 10 bar) alatt futtatható, és b) nagy koncentrációjú nátrium-hidroxiddal tisztítható. Az előnyös ágymagasság 10-15 cm, a javasolt terhelési tartomány 8-12 mg rhEpo/ml tömörített gyanta.

Az RPC lépés előtt a terméket tartalmazó felülúszót be kell állítani legfeljebb 0,24 M végső ammónium-szulfát koncentrációra. A kondicionálást egy, a feltöltési lépés előtti online hígítási lépéssel hajthatjuk végre [1 térfogatrész rhEpo-felülúszó + 4 térfogatrész 20 mM Tris/HCl (pH 7,0) + 5 térfogatrész 50 térfogat%-os acetonitril (ACN) 20 mM Tris/HCl-ben (pH 7,0) az RPC feltöltés során; vagy a drága szerves oldószer visszanyerése érdekében egy 20 mM Tris/HCl (pH 7,0) oldattal szembeni diafiltrálás/koncentrálás (ultrafiltrálás: 10 kDa cut-off)]. Az oszlopot 25 térfogat% acetonitrilt (ACN) tartalmazó 20 mM Tris (pH 7,0) oldattal elvilibráljuk a feltöltés előtt, és ugyanezzel az oldattal mossuk a feltöltés után. A terméket 25 → 50 térfogat% acetonitril lineáris gradienssel eluáljuk, amelynek során kis [különösen körülbelül 0,2 oszloptérfogat (CV), illetve egy alternatív megoldásban körülbelül 0,3-0,5 CV] frakciókat szedünk 4 térfogatrész hígító pufferbe; ily módon azonnal csökkentjük az oldószer-koncentrációt. A nagy oldószer-koncentráció aggregációt válthat ki és hátrányosan befolyásolja a következő AEX kromatográfiát. Az elúciós csúcs első felének megfelelő frakciókat egyesítjük, majd az így nyert RPC-oldatot feldolgozzuk. Ez az oldat tartalmazza az előnyös, nagymértékben glikozilezett izoformákat. Ezzel a frakcionálással eltávolítjuk azt a dez-O-glikozilezett

rhEpo terméket, amelyből a Ser216 helyzetnél hiányzik az O-glikán, és amely a sejttenyészetben akár 20 % mennyiségben is jelen lehet.

Egy alternatív megoldás értelmében a vírusoknak egy szerves oldószerrel történő inaktiválásához a frakciókat 4 térfogatrész 20 mM Tris (pH 7,0) helyett 0,5 térfogatrész ugyanilyen pufferbe szedjük, majd az oldatot 20-40 percen vagy még hosszabb időn keresztül inkubáljuk. Ez után az inkubációs lépés után a keverékhez további, az eredeti térfogatra vonatkoztatva 3,5 térfogatrész 20 mM Tris (pH 7,0) puffert adunk, és ezzel leállítjuk a vírus-inaktiválást.

Az adott esetben vírus-inaktivált frakciókat a további tisztításhoz egyesítjük. A frakciók egyesítését az emelkedő oldal maximális OD értékének 50-100 %-ánál kezdjük, és a csökkenő oldalon a körülbelül 70-80 % feletti frakciókkal fejezzük be. A korábbi eluátum frakciók gazdasejtproteineket tartalmazhatnak, míg a később eluálódó frakciók kevésbé szialilezett, kevésbé aktív izoformákat tartalmaznak. Ezenkívül bizonyos izoformák kigyűjtéséhez CZE (kapilláris zóna elektroforézis) analízist is végezhetünk.

Anioncserés kromatográfia

A hígított RPC-oldatot egy nagyteljesítményű anioncserés (AEX) oszlopra töltjük, amely szintén elősegíti a specifikus izoformák kiválasztását és a gazdasejtproteinek eltávolítását. Ennek során az izoformákat az izoelektromos pont, azaz a glikozilezés fokával arányos szialinsav-szám alapján választjuk el. Egy nagyteljesítményű, kiváló szeparációs hatékonyságú

gyantát [Q-Sepharose HP (Amersham Biosciences)] használunk.

Az RPC-oldatot 2-4 mg Epo/ml gyanta mennyiségben egy 20 mM Tris pH 7,0 pufferrel ekvilibrált Q Sepharose HP oszlopra töltjük. Egy ekvilibrációs pufferrel végzett mosási lépés után a terméket eluáljuk, amelynek során eluensként 10 oszloptérfogat (CV) mennyiségben egy ekvilibrációs pufferrel készített 0 → 300 mM lineáris nátrium-klorid gradienst alkalmazunk. Az elúciós csúcsot 0,1 CV vagy 0,25 CV frakciókba szedjük, majd a kívánt eritropoetin izoformákat tartalmazó megfelelő frakciók kiválasztásához CZE alkalmazásával analizáljuk a frakciókat. Az AEX-oldat jellemzően az előciós csúcs második feléből áll, ahol a nagymértékben glikozilezett és szialilezett izoformák eluálódnak.

A kapilláris zóna elektroforézis (CZE) mint folyamat közbeni kontroll alkalmazásával lehetőség nyílik az eritropoetin izoformák pontosan meghatározott keverékeinek az előállítására, még azokban az esetekben is, amelyekben a forrás az eltérő fermentációs körülmények és gazdarendszerek miatt csak alig tartalmaz nagymértékben szialilezett izoformákat.

A kapilláris zóna elektroforézis (CZE) az eltérő töltésű izoformák elkülönítésére alkalmas, nagy felbontású eljárás. A CZE minden egyes frakció esetén minden egyes egyedi izoformára kvantitatív eredményeket ad. Ennek az információnak a birtokában lehetőség nyílik arra, hogy a specifikus frakciók egyesítésével több sarzsból is konzisztens izoforma profilt alakítsunk ki. Jellemzően a korábban eluálódó, kevésbé szialilezett izoformákat kihagyjuk, és csak a később eluálódó frakciókat



egyesítjük.

Méretkizárásos kromatográfia (size exclusion chromatography, SEC)

Egy utolsó kromatográfiás lépésben az AEX-oldatot méretkizárással finomítjuk, amely eltávolítja a potenciális dimereket és nagyobb aggregátumokat, valamint a végső készítményhez elvégez egy puffercserét is. Az ebben a lépésben alkalmazott Superdex 75 prep grade (Amersham Biosciences) még akár az oszloptérfogat 15 %-ának megfelelő terhelésnél is jó felbontást biztosít. Az előnyös ágymagasság 60-80 cm.

Mivel arra nincs lehetőség, hogy az előző lépés szerinti AEX-kromatográfiát úgy hajtsuk végre, hogy az AEX-oldatban nagy termékkoncentrációt érjünk el, a gélszűrés előtt az oldatot be kell töményíteni. A betöményítést egy 5-10 kDa UF-membrénnal végzett ultrafiltrálással hajtjuk végre, amelynek eredményeként egy körülbelül tizedrészre betöményített, hozzávetőleg 10 mg eritropoetin/ml koncentrációjú UF-retentátumot nyerünk.

Egy 20 mM nátrium-foszfát (pH 7,0), 75 mM nátrium-klorid pufferrel pre-ekvilibrált Superdex 75 pg oszlopra körülbelül 3-7 CV% mennyiségben közvetlenül felvisszük az UF-retentátumot. Körülbelül 1-1,5 CV után kezd a termék eluálódni az oszlopról. Az elúciós csúcs összegyűjtésével a SEC-oldatot nyerjük.

Nanoszűrés

A potenicális vírustartalom eltávolítása érdekében egy végső vírusszűrési lépést is végrehajtunk. A szűrést egy

olyan, speciális, 15 nm méretű részecskék eltávolítására tervezett membránnal végezzük, amilyen például a Planova 15N (Asahi). Alternatív végső nanofiltrációs egységek a PALL Ultipor VF Grade DV20 vagy a Millipore Viresolve NFP patronok vagy kapszulák. Különösen az olyan, kisméretű, ki nem fejlődött vírusok, például parvovírusok esetében gyakorlatilag nincs más lehetőség a vírusok eltávolítására vagy inaktiválására.

A sterilre szűrt SEC-oldatot átszűrjük egy alkalmas membránt tartalmazó végső szűrőn. Az így nyert szűrlet alkotja a végső hatóanyagot. Egy alternatív megoldás értelmében a nanoszűrést elvégezhetjük az UF-koncentrálás és a méretkizárásos kromatográfia között is.

1. táblázat

Rekombináns CHO-sejtek:

transzfekciók Epo/neo-val és Epo/dhfr-rel

T25 transzfekciók

Transzfekció	Klónok száma/T25	Q_P, $9,6 \times 10^{-8}$ M MTX [μg/10⁶ sejt/nap]
09/T25/1 (50:1)	136	0,16
09/T25/2 (50:1)	107	2,6
09/T25/3 (5:1)	459	0,14
09/T25/4 (5:1)	648	0,9

96-vájtató lemez transzfekciók

Transzfekció	Klónok száma/lemez	Szelektált klón
09/96/1 (50:1)	47	1F5
09/96/2 (50:1)	46	
09/96/3 (50:1)	50	5D5, 3H5
09/96/4 (50:1)	52	
09/96/5 (50:1)	49	5D4, 5H4
09/96/6 (5:1)	416	6C5
09/96/7 (5:1)	556	7E9
09/96/8 (5:1)	392	
09/96/9 (5:1)	427	
09/96/10 (5:1)	352	
09/96/11 (75:1)	49	
09/96/12 (75:1)	60	12A9

Eltérő klónok amplifikálása

Klón	Q_P [µg/10 sejt/nap]		
	9,6 × 10⁻⁸ M MTX	1,9 × 10⁻⁷ M MTX	3,8 × 10⁻⁷ M MTX
09/96/1F5	11	11,4	17,1
09/96/3D5	8,4	14,4	11,4
09/96/3H5	8,2	14,1	12,9

Klón	Q _p [µg/10 sejt/nap]		
	$9,6 \times 10^{-8}$ M MTX	$1,9 \times 10^{-7}$ M MTX	$3,8 \times 10^{-7}$ M MTX
09/96/5D4	4,9	3,8	3,6
09/96/5H1	4,7	7,1	6,7
09/96/6C5	4,2	3,8	3,6
09/96/7E9	5,5	8,8	8,9
09/96/12A9	6		

2. táblázat

A 3D5 sejtek szubklónozási körülményei és lemezhatékonysága

(0,38 µM MTX-szel)

96-vájatú lemezek száma	Leoltott sejtek száma/vájat	Növekvő vájatok %	Egyedi klónok %
25 (6-30. sz.)	10	13	77
5 (1-5. sz.)	20	24	54

3. táblázat

A 3D5/1H9 és 3D5/18E5 szubklón szubklónozási körülményei és

lemezhatékonysága (1,54 µM MTX-szel)

3D5/1H9

96-vájatú lemezek száma	Leoltott sejtek száma/vájat	Növekvő vájatok %	Egyedi klónok %
8 (9-16. sz.)	10	6,4	85
8 (1-8. sz.)	30	19	46

3D5/18E5

96-vájtú lemezek száma	Leoltott sejtek száma/vájt	Növekvő vájatok %	Egyedi klónok %
8 (9-16. sz.)	4	15	56
8 (1-8. sz.)	8	29	44

4. táblázat

Rekombináns CHO-klónok fajlagos produktivitása és növekedési tulajdonságai

	4C2	6C2	6D4	15B4	7A6	15C3
inokulált sejtek száma [$\times 10^5$ sejt/ml)	2,17	2,67	2,89	0,71	2,38	2,16
végző sejtszám [$\times 10^5$ sejt/ml]	7,27	9,35	8,8	2,61	6,41	6,15
fajlagos növekedési sebesség μ [nap ⁻¹]	0,4	0,42	0,37	0,43	0,33	0,35

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy adott rekombináns polipeptid előállítására, **azzal jellemezve**, hogy

- (a) előállítunk egy transzformált eukarióta gazdasejtet, amely egy olyan nukleotid-szekvenciát tartalmaz, amely kódolja az adott rekombináns polipeptidet, és amely irányítja az adott rekombináns polipeptid expresszióját a gazdasejtben;
- (b) előállítunk egy olyan, szérummentes tápfolyadékot, amely
 - (i) a következő komponenseket tartalmazza: víz, egy növényi eredetű pepton, egy ozmolaritás regulátor, egy puffer, egy energiaforrás, aminosavak, egy lipidforrás vagy lipidprekurzor, egy vasforrás, vastól eltérő fémionok, valamint egy vagy több vitamin és ko-faktor, és (ii) nem tartalmaz semmilyen teljes hosszúságú polipeptidet; és
- (c) a transzformált eukarióta sejtet a tápfolyadékban olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek lehetővé teszik az adott rekombináns polipeptid expresszióját.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyésztőközeg állati eredetű komponensektől teljesen mentes.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az adott rekombináns polipeptid humán eritropoetin.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a rekombináns polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát a gazdasejt genomjába integráljuk, és operábilisen

egy dihidrofolát-reduktázt kódoló nukleotid-szekvenciához kötjük, és a gazdasejtet metotrexát nélkül tenyésztjük.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az adott rekombináns polipeptid humán eritropoetin.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az energiaforrás glükóz.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyésztőközeg kezdetben legalább 5 g/liter glükózt tartalmaz, és a koncentrációt a (c) tenyésztési lépés ideje alatt 3 g/liter érték felett tartjuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyésztőközeg 0,3 g/liternél több foszfátot tartalmaz.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyésztőközeg 0,3 g/liternél több foszfátot tartalmaz.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a pH értéke kezdetben körülbelül 7,1, és a (c) tenyésztési lépés ideje alatt ezt az értéket körülbelül 6,9-re csökkentjük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a csökkenés legalább egynapos időtartam alatt játszódik le.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyésztőközeg nyomelemeket és egy vagy több vitamint is tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, **azzal jelle-**

mezve, hogy az energiaforrás glükóz.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tenyésztőközeg 0,3 g/liternél több foszfátot tartalmaz.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a (c) tenyésztési lépés ideje alatt a tenyésztőközeget egy vagy több aminosavat, legalább egy szénhidrátot és egy növényi eredetű peptont tartalmazó dúsított tápanyaggal tápláljuk.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az eljárás magában foglalja az adott rekombináns polipeptidnek a tenyészetből történő kinyerési (d) lépését is.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az adott rekombináns polipeptid a tenyésztőközegbe szekretálódik, és az adott rekombináns polipeptidet a tenyésztőközegeből nyerjük ki.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az adott rekombináns polipeptid humán eritropoetin.

19. Szérummentes sejttenyésztő médium, amely (i) a következő komponenseket tartalmazza: víz, növényi eredetű pepton, ozmolaritás regulátor, puffer, energiaforrás, aminosavak, lipidforrás vagy lipidprekurzor, vasforrás, vastól eltérő fém-ionok, valamint egy vagy több vitamin és ko-faktor, és (ii) nem tartalmaz semmilyen teljes hosszúságú polipeptidet.

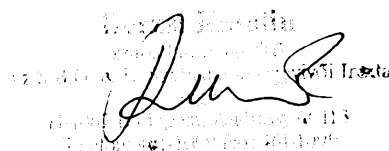
20. A 20. igénypont szerinti sejttenyésztő médium, amely állati eredetű komponensektől teljesen mentes.

21. A 19. vagy 20. igénypont szerinti sejttenyésztő médium, amelyben az energiaforrás glükóz.

22. A 19-21. igénypontok bármelyike szerinti sejttenyésztő médium, amely 0,3 g/liternél több foszfátot tartalmaz.

23. A 19-22. igénypontok bármelyike szerinti sejttenyésztő médium, amely nyomelemeket és egy vagy több vitamint is tartalmaz.

A meghatalmazott:


Magyarországi Ipatent Hivatal
Budapest, Mátyásföldi út 113.
1056 Budapest

36 8 8 8 8

~ 4

2004/179