



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319090

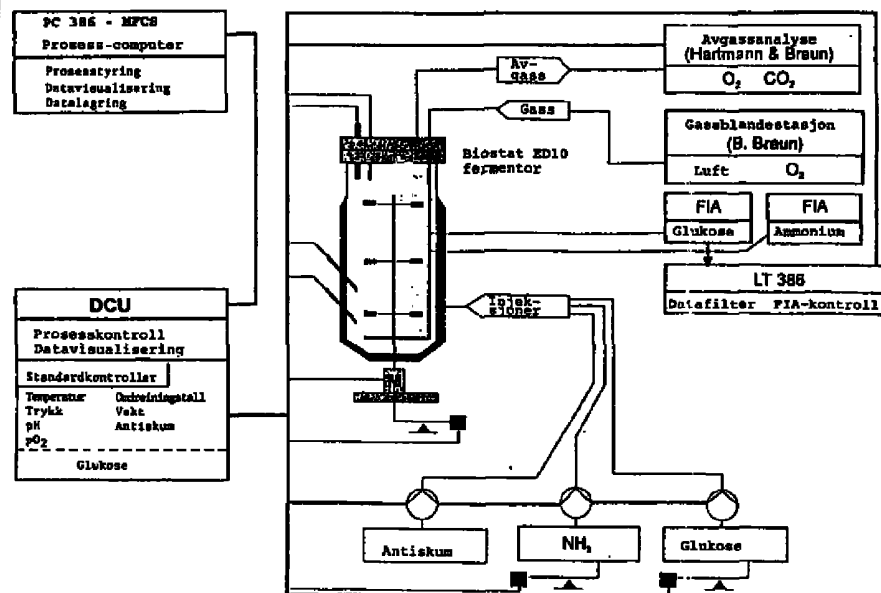
C 12 P 21/02, C 12 N 15/72, 1/21

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19982672	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.11.28 PCT/EP96/05260
(22)	Inng.dag	1998.06.10	(85)	Videreføringsdag	1998.06.10
(24)	Løpedag	1996.11.28	(30)	Prioritet	1995.12.11, EP, 95119478
(41)	Alm.tilgj	1998.06.10			
(45)	Meddelt	2005.06.20			
(73)	Innehaver	Merck Patent GmbH, Frankfurter Strasse 250, 64293 DARMSTADT, DE			
(72)	Oppfinner	Wolfgang Strittmatter, Heyerstrasse 16, DE-64372 Ober-Ramstadt, DE Siegfried Matzku, Zwingenberg, DE Dieter Riesenberger, Jena, DE Uwe Horn, Bad Frankenhausen, DE Uwe Knüpfer, Jena, DE Marian Kujau, , Jena, DE Rolf Wenderoth, Jena, DE Andreas Plückthun, Zürich, CH Anke Krebber, Zürich, CH			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av rekombinante proteiner i E. coli ved fermentering med høy celletetthet, E. coli-ekspresjonsvektor og transformert E. coli-ekspresjonsvert.			
(56)	Anførte publikasjoner	Bio/technology, vol. 11, nr. 11, 1993, s. 1271-1277, Pack, P. et al.			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen vedrører en "fed-batch"-fermenteringsfremgangsmåte med bestemte verts-vektor-systemer av E.coli for effektiv dannelsen av rekombinante proteiner, særlig rekombinante antistoffmolekyler, fortrinnsvis anti- stofffragmenter, slik som miniantistoffer. Ved de angitte betingelser kan E. coli-cellene vokse ved den maksimale, spesifikke veksthastighet til svært store celletettheter. Når rekombinant produkt dannelse starter, virker bare det dannede produkt på en begrensende måte på vekst. Vekstbegrensning ved hjelp av substrater eller metabolske biprodukter inntreffer ikke. Følgelig kan store mengder rekombinante proteiner fremstilles i forhold til rom og tid.



Oppfinnelsen vedrører en "fed-batch"-fermenterings-
fremgangsmåte hvor det gjøres bruk av spesielle *E. coli*
verts/vektor-systemer for virkningsfull dannelse av rekombin-
ante proteiner, særlig rekombinante antistoffmolekyler, spesi-
elt slike antistofffragmenter som miniantistoffer. Videre
vedrører oppfinnelsen *E. coli*-ekspresjonsvektor og trans-
formert *E. coli*-ekspresjonsvert.

Under betingelsene ifølge oppfinnelsen kan *E. coli*-
cellene vokse opp til svært høye celletettheter ved en maksi-
mal spesifikk veksthastighet. Etter at rekombinant dannelse av
produktet er blitt slått på, er det bare det dannede produkt
som har en begrensende effekt på vekst; substrater eller meta-
bolske biprodukter begrenser ikke vekst. På denne måte og i
sammenheng med de nye ekspresjonsvektorene som er spesielt
tilpasset for dette formål, og som utviser høy stabilitet, er
det mulig å oppnå høye romtidsutbytter av rekombinante pro-
teiner, hvor proteinene utviser høy biologisk aktivitet, sær-
lig i tilfellet med antistofffragmenter.

Kulturen av *E. coli*-celler til høye celletettheter er
en vesentlig forutsetning for virkningsfull, rekombinant pro-
teindannelse. De følgende kulturer tilhører teknikkens stand
for dette formål: etter ubegrenset vekst ($\mu = \mu_{maks.}$) i batchfasen
måles vanligvis en karbonkilde inn (glukose eller glyserol) i
den etterfølgende "fed-batch"-fase på en begrensende måte slik
at dannelsen av vekstinhiberende biprodukter, f.eks. acetat,
unngås, med den følge at veksten kan fortsettes på en måte som
bare er substratbegrenset ($\mu < \mu_{maks.}$) inntil høye celletettheter
er nådd (f.eks. Riesenberget al., 1991, J. Biotechnol., vol.
20, 17-28; Strandberg et al., 1994, FEMS Microbiol. Rev., vol.
14, 53-56; Korz et al., 1995, J. Biotechnol. 39, 59-65;
EP-B-0 511 226). Vekst ved en redusert veksthastighet resul-
terer naturlig i lange fermentasjonstider og følgelig også i
lavere romtidsutbytter. På grunn av det umiddelbare forbruk er
konsentrasjonen av karbonkilden i kulturopløsningen ved disse
fermentasjonene praktisk talt null. De substratbegrensede
betingelser endres ikke etter at den rekombinante produktdan-
nelse er blitt slått på.

Det er også kjent "fed-batch"-kulturer hvor det
gjøres bruk av *E. coli*, og hvor karbonkilden tilsettes diskon-

tinuerlig ved forholdsvis langvarige tidsintervaller og da i forholdsvis store mengder, idet en økning i pO_2 -verdien vanligvis anvendes som en indikator på substratuttømming for det formål å initiere den etterfølgende dose av karbonkilden

⁵ (f.eks. Eppstein et al., 1989, Biotechnol. 7, 1178-1181).

Denne fremgangsmåten betyr hyppig skifting fra forholdsvis langvarige substratoverskuddsbetingelser til substratbegrensende betingelser, og medfører følgelig metabolske ubalanser.

I det som følger, omhandles "fed-batch"-kulturer hvor
¹⁰ cellene kan vokse ved maksimal spesifikk veksthastighet ($\mu = \mu_{maks.}$) i "fed-batch"-fasen. "Fed-batch"-kulturer hvor forholdsvis store mengder karbonkilde tilsettes til kulturen ved forholdsvis langvarige tidsintervaller, i overensstemmelse med "off-line"-bestemmelser, for det formål å unngå substrat-
¹⁵ begrensninger, er eksperimentelt sett arbeidskrevende og lider av den ulempe at konsentrasjonen av karbonkilden endres konstant under hele fermentasjonen (f.eks. Pack et al., 1993, Biotechnol., vol. 11, 1271-1277, Hahn et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 100-107).

²⁰ "Fed-batch"-kulturer er også blitt beskrevet hvor konsentrasjonen av karbonkilden måles "on-line" og reguleres slik at begrensninger unngås, selv om disse kulturene, særlig i området med høy celletetthet, lider av ulempene som er beskrevet nedenunder. En autoklaverbar glukosebiosensor for bruk
²⁵ ved mikrobielle fermentasjoner i fermentorer med omrørt tank, er nylig blitt beskrevet (M.R. Phelps et al., 1995, Biotechnol. Bioeng., vol. 46, 514-524). Den ble brukt for *E. coli*-kulturer. Denne "in-situ"-sensor tilveiebringer, med en tidsforsinkelse på omtrent 2 minutter, den nåværende verdi i kulturoppløsningen. Signalet som fås ved hjelp av glukosesensoren, er blant annet avhengig av pH og pO_2 . Sensoren er ikke
³⁰ blitt testet i området med høy celletetthet ($X > 80$ g/l). Det er kjent fra erfaring at vekster på "in-situ"-prober når *E. coli* brukes, kan føre til ytterligere feilaktige verdier ved
³⁵ svært høye celletettheter. I tillegg er det ikke mulig å rekalkibrere sensoren nøyaktig under en pågående fermentasjon. Istedenfor å være basert på målinger under anvendelse av en "in-situ"-sensor, er andre fremgangsmåter basert f.eks. på

bestemmelse av karbonkildene under anvendelse av "on-line"-strømningsinjeksjonsanalysatorer (FIA) eller "on-line"-HPLC i en kulturopløsning som fjernes halvkontinuerlig fra fermentoren og gjøres cellefri ved å underkastes filtrering eller mikrosentrifugering (Kleman et al., 1991, Appl. Environ. Microbiol. 57, 910-917 og 918-923; Turner et al., 1994, Biotechnol. Bioeng. 44, 819-829). Forutsigelse og "feedback"-kontrollalgoritmer har redusert fluktuasjonene i glukosekonsentrasjonen under vekst opp til $X = 65 \text{ g/l}$ (Kleman et al., 1991, Appl. Environ. Microbiol., vol. 57, 910-917). I området med svært høye celletettheter (fra ca. 80 g/l til 150 g/l) blir det stadig vanskeligere og mer tidkrevende å separere cellene og næringsoppløsningen, slik at tidsforsinkelsen ved bestemmelse av den gjeldende glukoseverdi i fermentoren også øker på en biomasseavhengig måte og gjør det vanskeligere eller umulig å holde glukosenivået konstant. I motsetning til dette måles glukosekonsentrasjon med en tidsforsinkelse som er konstant og kort under anvendelse av en anordning som virker uten denne celleseparasjon (Pfaff et al., 1995, s. 6-11, i: Proceedings of the 6th International Conference on Computer Appl. in Biotechnol. Garmisch-Partenkirchen, Tyskland). I henhold til fremgangsmåten til Pfaff et al. anvendes en FIA som har en enzymatisk-amperometrisk glukosesensor i den umiddelbare nærhet av prøvetakingsstedet, etter at kulturen er blitt fortynnet med en vekstinhibitor.

Under aerob dyrkning danner *E. coli*-celler som ikke tvinges av doseringsregimet til å vokse på en substratbegrenset måte, vanligvis det metabolske biprodukt acetat i et økt omfang (Riesenbergs 1991, Curr. Opinion Biotechnol., vol. 2, 380-384), idet acetatet akkumulerer i næringsoppløsningen og har en vekstinhibitoreffekt når det er til stede i forholdsvis store mengder (Pan et al. 1987, Biotechnol. Lett., vol. 2, 89-94). Av denne grunn har det tidligere bare vært mulig å bevirke "fed-batch"-kulturer til høye celletettheter under anvendelse av spesielle *E. coli*-stammer hvis akkumulering av acetat er blitt redusert ved hjelp av spesifikke genetiske endringer, mens andre ulemper som er forbundet med dette, tolereres. Avkommet av *E. coli* K12 omfatter fosfotransacetyl-

asenegative mutanter (Bauer et al., 1990, Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, 1296-1302; Hahm et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, 100-107) hvis vekst imidlertid reduseres sterkt i glukose/mineralsaltmedium. Phelps og medarbeidere (se ovenfor) gjorde bruk av *E. coli*-stammen TOPP5 som vert for ikke-substratbegrenset dyrkning opp til en biomasse på $X = 85$ g/l. Denne *E. coli*-stamme som beviselig ikke akkumulerer acetat på en uttalt måte, er imidlertid ikke en K12-stamme. *E. coli* TOPP5 danner hemolysin og er følgelig en patogen stamme som ikke er egnet av sikkerhetsgrunner til anvendelse som en vert for dannelselse av rekombinante DNA-produkter i den industrielle sektor. En reduksjon i acetatakkumulering ved hjelp av spesifikk reorientering av den mellomliggende metabolisme ble oppnådd ved å transformere *E. coli*-celler med et plasmid som inneholder et gen som koder for acetolaktatsyntase (ALS) (San et al., 1994, i: Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 721, 257-267). Denne fremgangsmåten lider imidlertid av den ulempe at ustabiliteter vanligvis opptrer under betingelser med høy celletetthet når et ALS-kodende plasmid brukes i kombinasjon med et andre plasmid som bærer "produksjons"-genet. Virkningsfullheten av rekombinante produktdannelser reduseres ofte av plasmidustabiliteter, noe som opptrer i et økt omfang særlig i forbindelse med dyrkning til svært høye celletettheter.

Antistoffer eller antistoffragmenter, slik som Fab', F(ab')₂, miniantistoffer eller enkeltkjede-Fv-er, får stadig økende betydning innen den medisinske og bioteknologiske sfære. I det som følger nedenunder, skal et miniantistoff ifølge oppfinnelsen forstås å være et toverdig eller bispesifikt, enkeltkjedet Fv-fragment som er bundet ved hjelp av et pseudohengselsområde. I denne sammenheng kan det være viktig f.eks. ved kreftterapi, å gjøre tilgjengelig store mengder av antistoffer (omtrent 1 g/dose). I dette henseende kan enverdige antistoffragmenter eller fusjonsproteiner av disse fragmentene, eller multimere eller multispesifikke varianter derav, særlig lettvin og tilfredsstillende fremstilles i *E. coli*. Disse fragmentene eller variantene har en liten størrelse som er forbundet med en høy, spesifikk bindingskapasitet.

(F.eks. Plückerthun A., 1992, Immunol. Rev. 130, 151-188; Pack et al., 1995, J. Mol. Biol. 246, 28-34). Særlig proteiner og antistoffer må imidlertid foldes korrekt for å være biologisk og funksjonelt aktive. Når man vurderer utbyttet av dannet
 5 antistofffragment pr. celle, må man være oppmerksom på dette problemet i forbindelse med celletettheten. Dessuten er primærsekvensen til antistoffet av betydning ved bestemmelse av utbyttet *in vitro* og foldingen *in vivo* (Knappik A. og Plückerthun A., 1995, Protein Engin. 8, 81-89). Fab-fragmenter ut-
 10 trykkes således f.eks. som uoppløselige, cytoplasmiske eller periplasmiske aggregater og refoldes *in vitro*. Utbytter på ca. 0,14 g/l ved lav celletetthet (Condra et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 2292-2295) og opp til ca. 1-2 g/l av uoppløselige antistoffer ved middels celletetthet (Shibui et al., 1993,
 15 Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 770-775) er således blitt rapportert. Toverdige miniantistoffer (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1993, 1271-1277) kan også fås i *E. coli* i biologisk funksjonell form i utbytter på ca. 0,2 g/l. Gjennomsnittlig refoldes omtrent 5-45% av disse utbyttene korrekt.

20 I de kjente *E. coli*-systemer slås dannelsen av fremmedprotein som regel på ved en egnet måte etter at passende celletettheter er blitt nådd, ved hjelp av et regulerbart promotersystem som tilsvarende ekspresjonssystemet. Eksempler på
 25 promotersystemer som nevnes her, er (i) araBAD-promoteren i nærvær av AraC-repressoren (induserbar ved hjelp av arabinose) (f.eks. Better et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90, 457-461), (ii) phoA-promoteren (induserbar ved fjerning av fosfat) (f.eks. Carter et al., 1992, Biotechnol. 10, 163-167)
 30 og (iii) lac-promotersystemet (induserbart ved hjelp av IPTG) (Pack et al., 1993, loc. cit.). Selv om lac-systemet som regel tilveiebringer god ekspresjon, lider det av den ulempe at, på den ene side observeres uønsket grunnekspresjon før induksjon av promoteren og, på den annen side observeres plasmidustabilitet etter induksjon med IPTG.
 35

Ved en særlig utførelsesform av oppfinnelsen er det beskrevet en spesiell vektor (pHKK) som, som fremmedgen, inneholder sekvenser som koder for fragmenter av det murine eller humaniserte antistoff Mab 425. Mab 425 (ATCC HB 9629) er

et murint, monoklonalt antistoff som ble isolert fra den kjente, humane A432-kreftcellelinje (ATCC CRL 1555) og bindes til epitopen på humanepidermvekstfaktorreseptor (EGFR, et glykoprotein på ca. 170 kD), mens det inhiberer bindingen av den naturlige ligand EGF. Det er blitt vist at Mab 425 har en cytotoxisk effekt på tumorceller eller er i stand til å forstyrre veksten av disse cellene (Rodeck et al., Cancer Res. 1987, 47:3692). I WO 92/15683 beskrives humaniserte og kimære former av Mab 425, inkludert DNA- og aminosyresekvensene til deres lette og tunge kjeder.

Formålet ved oppfinnelsen var å gjøre tilgjengelig en fremgangsmåte for fremstilling av fremmedproteiner, særlig antistofffragmenter, i rekombinante *E. coli*-celler under betingelser med høy celletetthet (HCDC = kultur med høy celletetthet) med høye romtidsutbytter, og uten noen vesentlig forstyrrelse av vekst ved substrater eller metabolitter, og uten betydelige plasmidtap eller plasmidustabiliteter, samtidig som det sikres at det uttrykte protein utviser en høy grad av effektiv biologisk aktivitet (bindingskapasitet og korrekt folding).

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er en flertrinns "batch"-fremgangsmåte som det primært er verdt å legge merke til på grunn av det faktum at cellene er i stand til å vokse ved en maksimal hastighet under hele "batchen" ($\mu = \mu_{\max}$). Celletettheter fra 100 til 150 g/l (tørrvekt av biomasse) kan således til sist oppnås under anvendelse av den beskrevne fremgangsmåte. Dessuten inhiberes veksten ikke i et betydelig omfang av acetatakkumulering ettersom en slik akkumulering overraskende ikke er særlig uttalt under betingelsene som er valgt, særlig når det anvendes *E. coli*-stammer som i alle tilfeller bare er tilbøyelige til å danne reduserte mengder acetat under fermentasjonen. Dette oppnås, også i forbindelse med en serie av andre ytterligere tiltak, først og fremst i "fed-batch"-fasen som innføres etter en "batch"-fase, idet konsentrasjonen av karbonkilden i mediet holdes konstant i et definert område, mens det opprettholdes ubegrenset vekst av cellene. Ved å utforme den relevante ekspresjonsvektor på en passende måte, kan den uønskede grunnekspresjon av protein før

proteinsyntese slås på ved hjelp av et regulerbart promoter-system, også praktisk talt elimineres, på samme måte som plas-
midtapet kan, noe som noen ganger er vesentlig og som, som
allerede nevnt ovenfor, normalt kan observeres i ekspresjons-
5 systemer hvor det anvendes sterke promoterer, slik som lac-
promotersystemet.

Proteinutbytter med et gjennomsnitt fra 3 til 5 g/l
kan oppnås etter en total dyrkningstid fra ca. 25 til
35 timer. I tilfellet med antistofffragmentene, særlig mini-
10 antistoffene som er særlig kritiske på grunn av deres fold-
ingskriterier, er omtrent 80% av det syntetiserte materiale
biologisk aktivt og korrekt foldet.

Oppfinnelsen vedrører følgelig en fremgangsmåte for
fremstilling av fremmedprotein i *E. coli*-celler som er blitt
15 transformert med et plasmid som bærer fremmedgenet og en in-
duserbar promoter, ved hjelp av fermentasjon med høy celle-
tetthet ved "batch"- og "fed-batch"-stadier, uten noen be-
grensning på vekst ved hjelp av substrater eller metabolske
biprodukter, og isolering og rensing av det uttrykte protein
20 fra kulturmediet, idet konsentrasjonen av substrater i "fed-
batch"-fasen reguleres under anvendelse av et kontinuerlig,
automatisert eller halvautomatisert analyse- og tilsetnings-
system, idet i "fed-batch"-fasen (i) konsentrasjonen av kar-
bonkilden i mediet holdes konstant i et område mellom 0,1 g/l
25 og 25 g/l mens det opprettholdes ubegrenset vekst av cellene
($\mu = \mu_{maks.}$), (ii) produksjonen av fremmedproteinet startes i den
nevnte "fed-batch"-fase ved å indusere promoteren ved en cel-
letetthet mellom 10 og 80 g/l, og (iii) utnyttbart nitrogen og
fosfat, og også salter av sporelementer, tilføres kontinuerlig
30 etter at induksjon av produktsyntese har funnet sted, hvor
(iv) pO_2 -verdien reguleres til mellom 5 og 25% under hele "fed-
batch"-fasen ved å sende oksygen inn i fermentasjonsvæsken på
en passende måte.

Verdiene ifølge oppfinnelsen for den påkrevde konsen-
35 trasjon av karbonkilden under "fed-batch"-fasen er i et område
fra 0,1 g til 25 g/l. Et foretrukket område er mellom 0,5 og
15 g/l, særlig fra 1,0 til 5 g/l, eller fra 1,0 til 3 g/l. Den
særlig foretrukne konsentrasjon er 1,5 g/l. Foretrukne karbon-

kilder som kan nevnes, er glukose eller glyserol eller blandinger av disse to forbindelsene. Ifølge oppfinnelsen tilsettes karbonkilden på en kontinuerlig måte ("on-line") under anvendelse av et automatisert eller halvautomatisert tilsetnings- og analysesystem. Et "on-line"-strømningsinjeksjons-analysesystem (FIA) anvendes fortrinnsvis.

Tilførselen av utnyttbart nitrogen, fortrinnsvis ammoniumnitrogen og fosfat, f.eks. diammoniumhydrogenfosfat eller ammoniumdihydrogenfosfat, og også sporelementer, f.eks. salter av bor, mangan, kobber, molybden, kobolt, jern eller sink som er oppløselig i mediet, finner sted i "fed-batch"-fasen som innsettes etter "batch"-fasen, fortrinnsvis etter at proteinsyntese er slått på under anvendelse av den regulerbare promoter, ved en celletetthet fra 50 til 80 g/l (tørrvekt av biomasse), fortrinnsvis ca. 70 g/l, ved en total veksthastighet fra 100 til 150, fortrinnsvis 140, g/l.

Ifølge oppfinnelsen slås proteinsyntese på ved å aktivere det regulerbare promotersystem ved en celletetthet fra 10 til 80 g/l, fortrinnsvis fra 20 til 60 g/l, idet det er særlig foretrukket at området er fra 40 til 50 g/l.

Under "fed-batch"-fasen er partialtrykket for oksygen mellom 5 og 25%, fortrinnsvis mellom 15 og 25%, særlig foretrukket 20%.

Ifølge oppfinnelsen må pH i fermentasjonsmediet reguleres under hele "batchen" til mellom 6,5 og 7,0, fortrinnsvis til mellom 6,7 og 6,9, særlig til 6,8.

Oppfinnelsen vedrører dessuten en tilsvarende fremgangsmåte hvor det anvendes en ekspresjonsvektor som har en ekspresjonskassett som inneholder fremmedgenet og er flankert av to terminatorsekvenser. Disse terminatorsekvensene, særlig den som er plassert oppstrøms, forhindrer på vellykket måte uønsket ekspresjon av protein før ekspresjonen slås på av promotersystemet. Selv om terminatoren t_{hp} (Nohno et al., 1988, J. Bacteriol. 170, 4097-4102) er særlig egnet, kan det også anvendes andre kjente terminatorsekvenser.

Oppfinnelsen vedrører dessuten en fremgangsmåte hvor ekspresjonsvektoren som anvendes, i tillegg inneholder et selvmordssystem. Selvmordssystemet produserer et protein som

er toksisk for cellen dersom plasmidet ikke er til stede i cellen. Egnede selvmordssystemer er kjent fra litteraturen. Et selvmordssystem som er særlig egnet for oppfinnelsen, er "hok-sok"-systemet (f.eks. Gerdes K., 1988, Biotechnol. 6, 1402-
 5 1405). Det er således viktig for at fremgangsmåten skal danne rekombinante proteiner effektivt, særlig antistoffmolekyler, at verts/vektor-systemet er kjennetegnet i området med høy celletetthet, ved høy plasmidstabilitet, lav, rekombinant grunnekspresjon og høy produktdannelse. I denne sammenheng er
 10 selvmordssystemer i kombinasjon med rekombinante ekspresjonskassetter som er flankert av terminatorer, vektorspesifikke.

Oppfinnelsen vedrører dessuten en tilsvarende fremgangsmåte hvor det anvendes et fremmedgen som koder for et antistofffragment, særlig et miniantistoff.

15 Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte hvor det anvendes ekspresjonsvektorer som har ytterligere trekk som er beskrevet nedenunder.

I prinsippet kan det anvendes de fleste av *E. coli*-stammene som er kjent og som er egnet for rekombinasjonsteknologi, og for fremstilling i en industriell skala. På fordelaktig måte anvendes fortrinnsvis de stammene som akkumulerer
 20 forholdsvis lite acetat under vekst til høye celletettheter. De stammene er særlig egnet som utviser en acetatanrikning på mindre enn 5 g/l. Overraskende kan acetatakkumuleringen holdes
 25 særlig lav ved å anvende de valgte betingelser for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Den velkjente og kommersielt tilgjengelige *E. coli*-stamme RV308 (ATCC 31608) og dens varianter som har den samme effekt, er særlig egnet i dette henseende.

Oppfinnelsen vedrører derfor særlig en tilsvarende
 30 fremgangsmåte hvor det anvendes en *E. coli*-stamme som utviser en acetatakkumulering på mindre enn 5 g/l i kulturmediet under fermenteringen.

Oppfinnelsen vedrører også en *E. coli*-ekspresjonsvektor som er egnet for å uttrykke fremmedproteiner under fermentasjonsbetingelser med høy celletetthet, og som har de følgende trekk:

- (1) en oppstrømsterminatorsekvens og en nedstrømsterminatorsekvens,

- (ii) lac-promoter/operatorsystemet,
- (iii) en T7g10 Shine Delgarno-sekvens,
- (iv) pelB- eller ompA-signalsekvensen,
- (v) sekvensen til fremmedgenet, og,

5 ved en foretrukket utførelsesform, også et selvmordssystem, særlig "hok-sok"-selvmordssystemet.

Ifølge oppfinnelsen kan promotersystemet også erstattes med andre egnede systemer, f.eks. de som er nevnt ovenfor. Likeledes omfattes andre signalsekvenser og kontrollsekvenser
10 som har den samme effekt, også av oppfinnelsen.

Endelig vedrører oppfinnelsen ekspresjonsvektoren pHKK (figur 2) som er definert ved sin konstruksjon og som inneholder sekvensene for miniantistoffet som er avledet fra Mab 425, og en spesiell, rekombinant *E. coli*-vert RV308 [pHKK]
15 som spesielle utførelsesformer.

Beskrivelse av figurene:

Figur 1: Forsøksoppstilling for bioreaktoren for fremstilling av proteiner under betingelser med høy
20 celletetthet. Systemet er utstyrt med en måle-anordning, en displayanordning, en kontroll-anordning og en utmålingsanordning.

Figur 2: Optimalisert ekspresjonsvektor pHKK og bestanddeler i dens konstruksjon. Vektoren er hovedsakelig bygd opp av bestanddeler fra de kjente vektorene pASK40, pAK100 og pKG1022.
25

Figur 3(a-d): HCD-kultur av rekombinant *E. coli* under anvendelse av eksemplet på *E. coli* RV308 [pHKK]:
30 kronologisk forløp for biomasse, glukose, ammoniumnitrogen, fosfat, acetat, rørehastighet, pO₂, O₂ og CO₂ i avgassen, plasmidstabilitet (uttrykt som % av β-laktamasepositive kolonier) og dannelsen av protein (i dette tilfellet: scFv₄₂₅dhlx). "Batch"- og "fed-batch"-fasene er
35 delt i fem underfaser. IPTG-pilen indikerer starten på proteinproduksjon.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes det transformerte *E. coli*-vertsceller. Plasmidkonstruksjonene som

er valgt, avhenger av typen av proteinet som skal uttrykkes. Trekk ved disse plasmidkonstruksjonene som er særlig gunstige, er beskrevet nedenunder. Teknikkene og fremgangsmåtene som er påkrevet for plasmidkonstruksjon og for vertscelletransformasjon, er alle kjente og beskrevet nærmere i litteraturen (f.eks. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). I tillegg forklares de i eksemplene under anvendelse av de bestemte utførelsesformer av oppfinnelsen. Utgangsplasmider eller plasmiddeler er enten erholdbare kommersielt eller kan konstrueres uten vanskelighet ved å anvende standardmetoder som er basert på kjente konstruksjonsskjemaer.

Den forutgående "batch" i en typisk fermentasjon ifølge oppfinnelsen av transformerte *E. coli*-celler er delt i to underfaser. Etter inokulasjon med en passende preliminær kultur er underfase I kjennetegnet ved en forsinkelsesfase hvor cellene tilpasser seg og veksthastigheten μ deretter øker til $\mu_{maks.}$. Under underfase II vokser cellene eksponentielt ved $\mu = \mu_{maks.}$. Etter at pO_2 har falt fra 100% metning ned til mindre enn 5-15%, reguleres pO_2 -verdien ved å kontrollere hastigheten til pO_2 -agitatoren, til pO_2 -verdier som fortrinnsvis er mellom 15 og 25%, fortrinnsvis rundt 20% (figur 3c). Denne reguleringen (ved å sende inn luft som er anrikt på rent oksygen) bør utføres ved ca. 6-12 timer etter påbegynt fermentasjon av hovedkulturen. Glukosekonsentrasjonen som til å begynne med fortrinnsvis var mellom 20 og 35 g/l, avtar mot slutten av underfase II som også utgjør slutten på "batch"-fasen som går forut for "fed-batch"-fasen. I denne forbindelse bør glukosekonsentrasjonsverdiene ikke under noen omstendigheter falle under 0,1 g/l. Fra nå av forhindres dette ved den passende tilførsel av glukose (underfase III, figur 3a, start på "fed-batch"-fasen). I overensstemmelse med oppfinnelsen holdes glukoseverdien konstant mellom 0,1 og 25 g/l, fortrinnsvis imidlertid mellom 1 og 3 g/l. Fødemediet FS1 (tabell 1) kan f.eks. anvendes til dette formål. Ettersom dette glukosekonsentrasjonsområde er tilstrekkelig langt over K_s -verdien for glukose (Bergter, 1983, "Wachstum von Mikroorganismen", s. 41, Gustav Fischer Verlag, Jena), kan cellene fortsette å vokse ved $\mu_{maks.}$.

Ifølge oppfinnelsen overvåkes glukosekonsentrasjonen og reguleres under anvendelse av et automatisert eller halvautomatisert system. Strømningsinjeksjonsanalysesystemer ved "on-line"-operasjon er særlig egnet. Rent manuelle eller stort sett manuelle systemer er blitt funnet å være upassende. Selv om "fed-batch"-fasen begynner mellom ca. timene 15 og 22, avhenger dette til sist av forskjellige individuelle faktorer, slik som temperatur, mediumsammensetning, mediumkonsentrasjon, reaktorstørrelse, etc., og særlig også av typen av *E. coli*-stammen som anvendes. Fordelaktig slås syntese av fremmedproteinet på ved ca. fra 4 til 8 timer etter begynnelsen av "fed-batch"-fasen. Den nøyaktige tid avhenger imidlertid til sist av celletettheten til kulturen som allerede er blitt nådd på dette tidspunkt. Celletettheter mellom 10 og 80 g/l, fortrinnsvis mellom 20 og 60 g/l, er særlig gunstige dersom endelige celletettheter fra 100 til 150 g/l skal nås. Det er følgelig generelt gunstig for å starte proteinsyntesen dersom fra ca. 10 til 60% av den maksimale celletetthet som skal nås, er til stede på induksjonstidspunktet.

Proteinsyntese tilveiebringes ved å slå på det regulerbare promotersystem. Avhengig av systemet som anvendes, bevirkes denne påslåing som regel ved å tilsette et stoff eller ved å endre en fysikalsk mengde. I tilfellet med det foretrukne lac-system (promoter, operator og starter) bevirkes påslåingen ved å tilsette IPTG (isopropyłtiogalaktopyranosid). Den videre vekst av cellene begrenses nå bare av det akkumulerende produkt. Av denne grunn er det viktig ifølge oppfinnelsen at ikke noen betydelig grunnekspresjon som ville utøve en ugunstig påvirkning på totalvekst og følgelig på totalutbytte, kan finne sted før induksjon. Ifølge oppfinnelsen sørges dette for av ekspresjonskassetten i plasmidet som flankeres av virkningsfulle terminatorsekvenser.

Fra det tidspunkt glukose begynner å bli tilført, blir fermenteringsmediet utarmet på nitrogen og fosfat (figur 3a, b). For å unngå begrensninger av hvilken som helst type, tilføres nitrogen og fosfat fortrinnsvis likeledes ved hjelp av en passende, kontinuerlig fremgangsmåte. Formålstjenlig nitrogen leveres i form av ammoniumsalter ettersom påvirkning

- på denne måte også samtidig kan bringes til å øke pH (fra 6,5 til 7,0, fortrinnsvis 6,8). For eksempel er oppløsningen FS2 egnet (tabell 1). Underfase IV er kjennetegnet ved tilførselen ifølge oppfinnelsen av sporelementer (f.eks. bor, mangan,
- 5 jern, kobolt, molybden og sink) i form av deres oppløselige salter. Som regel bevirkes tilsetningen kontinuerlig ved en konstant hastighet. Underfase V er kjennetegnet ved redusert vekst, hovedsakelig på grunn av produktakkumulering. I tillegg kan det observeres en svak økning i acetatkonsentrasjonen.
- 10 Akkumuleringen av acetat og konsentreringen av acetat i mediet er imidlertid overraskende lav. Dette kan også tilskrives de spesielle fremgangsmåtebetingelsene. *E. coli*-stammer som utviser en maksimal acetatanrikning under fermenteringen, på < 5 g/l, forsterker klart denne effekten enda ytterligere.
- 15 Avhengig av typen av proteinet, varierer utbyttene av protein gjennomsnittlig mellom 2 og 6 g/l. Av dette er mellom 50 og 95% biologisk aktivt, igjen avhengig av typen av proteinet. I tilfellet med antistofffragmenter refoldes mer enn 80% av proteinet som fås. Disse verdiene overskrider klart de
- 20 som ble oppnådd ved sammenlignbare fremgangsmåter som tidligere er blitt beskrevet i teknikkens stand.
- Preferanse gis til anvendelse av fremgangsmåten som er blitt beskrevet, inkludert ekspresjonsplasmidene som er blitt spesielt konstruert og tilpasset for dette formål, for
- 25 effektiv fremstilling av antistofffragmenter, særlig miniantistoffer. Det er imidlertid også mulig på fordelaktig måte å fremstille mange andre proteiner, fusjonsproteiner eller enzymer under anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Eksempler på slike egnede proteiner er hybridstreptokinase og
- 30 glukosedehydrogenase, eller ellers proteiner som har en effekt på blodkoagulasjon, f.eks. hirudin, trombin, hementin eller teromin.

Tabell 1

Sammensetning av mediene; FS1, FS2 og FS3
utgjør næringsmediene som brukes i de for-
skjellige underfasene av "fed-batch"-fasen

5

10

15

20

25

30

	Forbindelse	Preliminært kultur- medium mg/l	Hoved- kultur- medium mg/l	FS1 mg/l	FS2 mg/l	FS3 mg/l
1	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,6x10 ³				
2	K ₂ HPO ₄	3x10 ³	16,6x10 ³			
3	(NH ₄) ₂ HPO ₄		4x10 ³		227x10 ³	
4	(NH ₄)H ₂ PO ₄				169,5x10 ³	
5	NH ₄ Cl	1x10 ³				
6	NaCl	5x10 ²				
7	Sitronsyre		2,1x10 ³			
8	Fe(III)sitrat- hydrat	60,0	75,0			5x10 ³
9	H ₃ BO ₃	3,0	3,8			250
10	MnCl ₂ x4H ₂ O	15,0	18,8			125
11	EDTAx2H ₂ O	8,4	10,5			700
12	CuCl ₂ x2H ₂ O	1,5	1,9			125
13	Na ₂ MO ₄ x2H ₂ O	2,5	3,1			213
14	CoCl ₂ x6H ₂ O	2,5	3,1			213
15	Zn(CH ₃ COO) ₂ x2H ₂ O	8,0	10			668
16	Glukose	10x10 ³	25x10 ³	670x10 ³		
17	MgSO ₄ x7H ₂ O	600	1,5x10 ³	19,8x10 ³		
18	Ampicillin	100	100			

Eksempel 1

35

Den prototrofe *E. coli* K12-stamme RV308 (lac74-galISII::OP308strA) (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161; ATCC 31608) ble brukt til å fremstille en rekombinant *E. coli*-vert. Med mindre det er forklart annetsteds, ble

transformasjon med en vektor som var egnet for ekspresjonen, og alle andre påkrevde DNA-manipulasjoner, utført ved å anvende standardmetoder. Plasmidfrie *E. coli* RV308-celler ble anvendt som kontroll i en tilsvarende fermentasjon med høy
 5 celletetthet.

Vektoren pHKK ble konstruert på følgende måte (figur 2): det lille MluI-fragment fra pAK100 (Krebber and Plückthun, 1995) som inneholder den sterke transkripsjonsterminatoren t_{HP} (Nono et al., se ovenfor) i oppstrømsregionen til lac p/o, ble
 10 innført i plasmidet pASK40 (Skerra et al., 1991, Biotechnol. 9, 273-278). "Hok-sok"-DNA-en ble innført ved hjelp av to ytterligere kloningstrinn: aphA-genet fra pKG1022 (Gerdes, 1988, se ovenfor) ble fjernet ved dobbeltfordøyelse med XhoI og EcoRI, igjenfylt med DNA-polymerase I (Klenow-fragment) og
 15 religert. I et andre trinn ble det modifiserte BamHI-fragment fra pKG1022 klonet i det eneste BamHI-spaltingssete i det første kloningsprodukt. Miniantistoffet avledes fra et enkeltkjede-ab-fragment hvor de variable domenene i V_H - V_L -retningen var forbundet med en fleksibel linker (gly₄ser)₃, etterfulgt av
 20 en prolinrik hengselsregion og et modifisert heliks-"turn"-heliks-domene (dhlx) (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1271-1277). DNA-sekvensene, primerne, amplifikasjonene og kloningene av lett- og tungkjeden i murin/humanisert Mab 425 er beskrevet nærmere i WO 92/15683. For å sikre sekresjon av
 25 scFv425dhlx-fragmentet i periplasmaet ble V_H -domenet fusjonert N-terminalt til pelB-signalsekvensen. T7g10-ribosombindingssetet (Shine Dalgarno) ble klonet under anvendelse av PCR-metodikk i XbaI- og SfiI-spaltingssetene i pEG1 (Strittmatter et al., 1995). Den endelige, ferdige scFv425dhlx-ekspresjons-
 30 kassetten ble klonet mellom XbaI- og HindIII-spaltingssetene. Dette ga ekspresjonsvektoren pHKK som er vist i figur 2.

Eksempel 2

Sammensetningen av mediene til de preliminare kul-
 35 turene i Erlenmeyer-kolber, av hovedkulturen i en tankreaktor utstyrt med en agitatormekanisme (Biostat ED10, B. Braun, Biotech International, Melsungen, Tyskland) og av næringsmediene FS1, FS2 og FS3, er oppstilt i tabell 1. Hovedkulturmediet

(8 l) ble modifisert sammenlignet med mediet til Riesenberget al., 1991 (se ovenfor). For å forhindre utfellinger ble bestanddelene tilsatt i den rekkefølge som er angitt i tabell 1. Glukose og magnesiumsulfat ble tilsatt som separat autoklaverte oppløsninger. Reaktoren ble drevet ved 26 °C, et trykk på 0,15 mPa, en pH på 6,8 og en gjennomsnittlig lufthastighet på 10 l/min. 25% vandig ammoniakk ble brukt til å regulere pH. Ammoniakk og "Ucolub N115" (Fragol Industrieschmierstoffe GmbH, Mühleim/Ruhr, Tyskland) ble tilsatt under fermenteringen ved hjelp av en sensorkontroll, hhv. for å regulere pH og som et avskummingsmiddel. FS1 ble fremstilt på følgende måte: 750 g glukose og 22,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ble oppløst separat i hhv. 600 ml H_2O og 50 ml H_2O . Oppløsningene ble blandet med hverandre etter å være blitt autoklavert. FS2 ble fremstilt ved å oppløse 227 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ og 169,5 g $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ i vann mens det samtidig ble tilsatt 60 ml 25% NH_3 for å regulere pH til 6,8 før autoklaving. FS3 ble fremstilt fra standardoppløsninger i den følgende rekkefølge: 50 ml $\text{Fe(III) sitrathydrat}$ (6 g/l), 0,5 ml H_3BO_3 (30 g/l), 0,5 ml $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (10 g/l), 0,5 ml $\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (84 g/l), 0,5 ml $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (15 g/l), 0,5 ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (25 g/l), 0,5 ml $\text{CoCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (25 g/l) og 10 ml $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (4 g/l).

Eksempel 3

Flere kolonier fra en petriskål hvor de var blitt dyrket på LB-agar ved 26 °C, ble brukt til å overinokulere 20 ml flytende LB-medium. Etter 5 timers risting (200 rpm, 26 °C) ble 1 ml overført til 100 ml preliminært kulturmedium i en 500 ml kolbe, og den sistnevnte ble så underkastet videre inkubasjon. 10 ml av denne preliminære kultur ble brukt for å overinokulere 100 ml nytt, preliminært kulturmedium. På denne måte ble 9 preliminære kulturer fremstilt som ble anvendt sammen for å overinokulere 8 l av hovedkulturmediet i fermentor til en sluttelig $\text{OD}_{550} \approx 0,2$.

Eksempel 4

Oppstillingen av den 10 l store bioreaktoren sammen med tilbehør og kontrollutstyr er vist i figur 1. Dyrkningen i en fermenteringsskala med høy celletetthet ble utført under

anvendelse av en digital måle- og kontrollenhet (DCU), et multifermentorkontrollsystem (MFCS) og en gasstrømningskontrollenhet. CO₂- og oksygenfrigjørelse ble hele tiden målt. Etter overinokulasjon ble bioprøveoppsamleren MX-3 (New Brunswick Scientific, Watford, UK) brukt til å ta aseptiske prøver og muliggjøre "off-line"-dataanalyse (Webb et al., 1990, Biotechnol. 8, 926-928). Kontrollenhetene opprettholdt en innløpsgasstrømningshastighet på 10 l/min, en pH på 6,8, en temperatur på 26 °C og et trykk på 0,15 MPa. To kontrollsløyfer

10 garanterte aerobe vekstbetingelser ved en pO₂ på 20%. Alle de viktige fysikalske mengdene ble vist og målt under hele fermenteringen.

Under "fed-batch"-fasen holdes glukosekonsentrasjonen i kulturen på 1,5 g/l. Et modifisert strømningsinjeksjons-

15 analyseapparat (FIAstar 5020 analyseapparat utstyrt med et fotometer og en påvisningskontrollenhet, Tecator AB, Sverige) ble brukt til dette formål. Detaljer vedrørende dette systemet og vedrørende dets driftsmåte er beskrevet i teknikkens stand (f.eks. Pfaff et al., 1995, i Munack A. og Schügerl K. (red.):

20 Computer Applications in Biotechnology, Elsevier Science Ltd., Oxford, 6-11).

Celletettheten ble beregnet ved å måle den optiske tetthet ved 550 nm. Plasmidstabiliteten ble bestemt ved hjelp av metoden til Pack et al., 1993 (se ovenfor).

25

Eksempel 5

De syntetiserte miniantistoffer ble bestemt kvantitativt under anvendelse av metoden til Pack et al., 1993 (se ovenfor). Mengden av funksjonelle miniantistoffer ble bestemt

30 ved hjelp av ELISA, og totalmengden av miniantistoffer ved hjelp av SDS-PAGE i en 12% polyakrylamidgel i overensstemmelse med Laemmli (1970), etterfulgt av gelskanning. For ELISA-ene ble mikrotiterplater belagt med human EGFR-reseptor (f.eks. fra WO 92/15683). De bundne miniantistoffer ble påvist med

35 anti-scFv425-kaninserum og peroksidasekonjugert geite-anti-kanin-IgG (Jackson Immunoresearch Inc., USA). Utbyttet av aktive miniantistoffer ble beregnet fra fortynningsserier fremstilt fra de rensede miniantistoffer. Ved en kontroll ble det

vist at anti-scFc425-kaninserumet ikke utviste noen observer-
bar kryssreaksjon med andre komponenter i den plasmidfrie
råekstrakt av *E. coli* RV308. Dessuten hadde tilsetning av
denne råekstrakten til en fortynningsserie fremstilt fra det
5 samme antistoff i rensset form, ingen effekt på ELISA-
signalene. For å bestemme totalmengden av miniantistoffer ble
geler farget med Coomassie "brilliant blue", påvist foto-
metrisk, og konsentrasjonen av miniantistoffene ble beregnet
ut fra en fortynningsserie fremstilt fra det rensede minian-
10 tistoff som var blitt fraksjonert på den samme gel. En analog
blanding hvor det ble brukt *E. coli*-vertsceller som ikke pro-
duserte noen miniantistoffer, tjente som kontroll.

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av fremmedprotein i *E. coli*-celler som er blitt transformert med et plasmid som bærer fremmedgenet og en induserbar promoter, ved hjelp av fermentasjon med høy celletetthet ved hjelp av "batch"- og "fed-batch"-stadier, uten noen begrensning av vekst ved substrater eller metabolske biprodukter, og isolering og rensing av det uttrykte protein fra kulturmediet, idet konsentrasjonen av substrater i "fed-batch"-fasen reguleres under anvendelse av et kontinuerlig, automatisert eller halvautomatisert analyse- og tilsetningssystem, k a r a k t e r i s e r t v e d a t, i "fed-batch"-fasen
15 (i) konsentrasjonen av karbonkilden i mediet holdes konstant i et område mellom 0,1 g/l og 25 g/l samtidig som det opprettholdes ubegrenset vekst av cellene ($\mu = \mu_{maks.}$), (ii) fremstillingen av fremmedproteinet startes i "fed-batch"-fasen ved å indusere promoteren ved en celletetthet mellom 10 og 80 g/l, og
20 (iii) utnyttbart nitrogen og fosfat, og også salter av sporelementer, tilføres kontinuerlig etter at induksjon av produksyntese har funnet sted, idet (iv) pO_2 reguleres til mellom 5 og 25% under hele "fed-batch"-fasen ved å sende oksygen inn i fermentasjonsvasken på en passende måte.
25
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t konsentrasjonen av karbonkilden holdes konstant i et område mellom 1 og 3 g/l under "fed-batch"-fasen.
30
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nitrogen, fosfat og sporelementer tilsettes ved en celletetthet mellom 50 og 80 g/l.
35
4. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t celletettheten ifølge (ii) i krav 1 er fra 20 til 60 g/l.

5. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1-4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at celletettheter mellom
100 og 150 g/l kan oppnås i "fed-batch"-fasen.
- 5 6. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1-5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en ekspres-
sjonsvektor som har en ekspresjonskassett som inneholder frem-
medgenet, og som er flankert av to terminatorsekvenser.
- 10 7. Fremgangsmåte ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at ekspresjonsvektoren som
anvendes, i tillegg inneholder et selvmordssystem, fortrinns-
vis "hok-sok"-selvmordssystemet.
- 15 8. Fremgangsmåte ifølge krav 6 eller 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes et frem-
medgen som koder for et antistoffragment, særlig et minianti-
stoff.
- 20 9. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1-4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en ekspres-
sjonsvektor ifølge ett av kravene 12-16.
10. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1-9,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en *E.*
coli-stamme som under fermentasjonsfasen akkumulerer ikke mer
enn 5 g/l acetat i kulturmediet.
11. Fremgangsmåte ifølge krav 10,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli*-stammen RV308
(ATCC 31608) anvendes.
12. *E. coli*-ekspresjonsvektor egnet for å uttrykke frem-
medproteiner under fermentasjonsbetingelser med høy celletett-
35 het,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder de føl-
gende trekk:
(i) en oppstrømsterminatorsekvens og en nedstrøms-

terminatorsekvens,

- (ii) lac-promoter/operatorsystemet,
- (iii) en T7g10 Shine Dalgarno-sekvens,
- (iv) pelB- eller ompA-signalsekvensen, og
- (v) sekvensen til fremmedgenet.

5

13. Vektor ifølge krav 12,
karakterisert ved at den i tillegg inneholder et selvmordssystem, særlig "hok-sok"-selvmordssystem-sekvensen.

10

14. Vektor ifølge krav 12 eller 13,
karakterisert ved at oppstrømsterminatorsekvensen er t_{HP} og nedstrømsterminatorsekvensen er t_{LPP} .

15

15. Vektor ifølge ett av kravene 12-14,
karakterisert ved at fremmedgenet inneholder en sekvens som koder for V_H -kjeden og V_L -kjeden i et minianti-stoff.

20

16. Ekspresjonsvektor med betegnelsen pHKK,
karakterisert ved at den er i henhold til konstruksjonsskjemaet vist i figur 2.

25

17. Transformert *E. coli*-ekspresjonsvert RV308 [pHKK],
karakterisert ved at den kan erholdes ved å transformere RV308 (ATCC 31608) med en ekspresjonsvektor ifølge krav 16.

Fig. 1

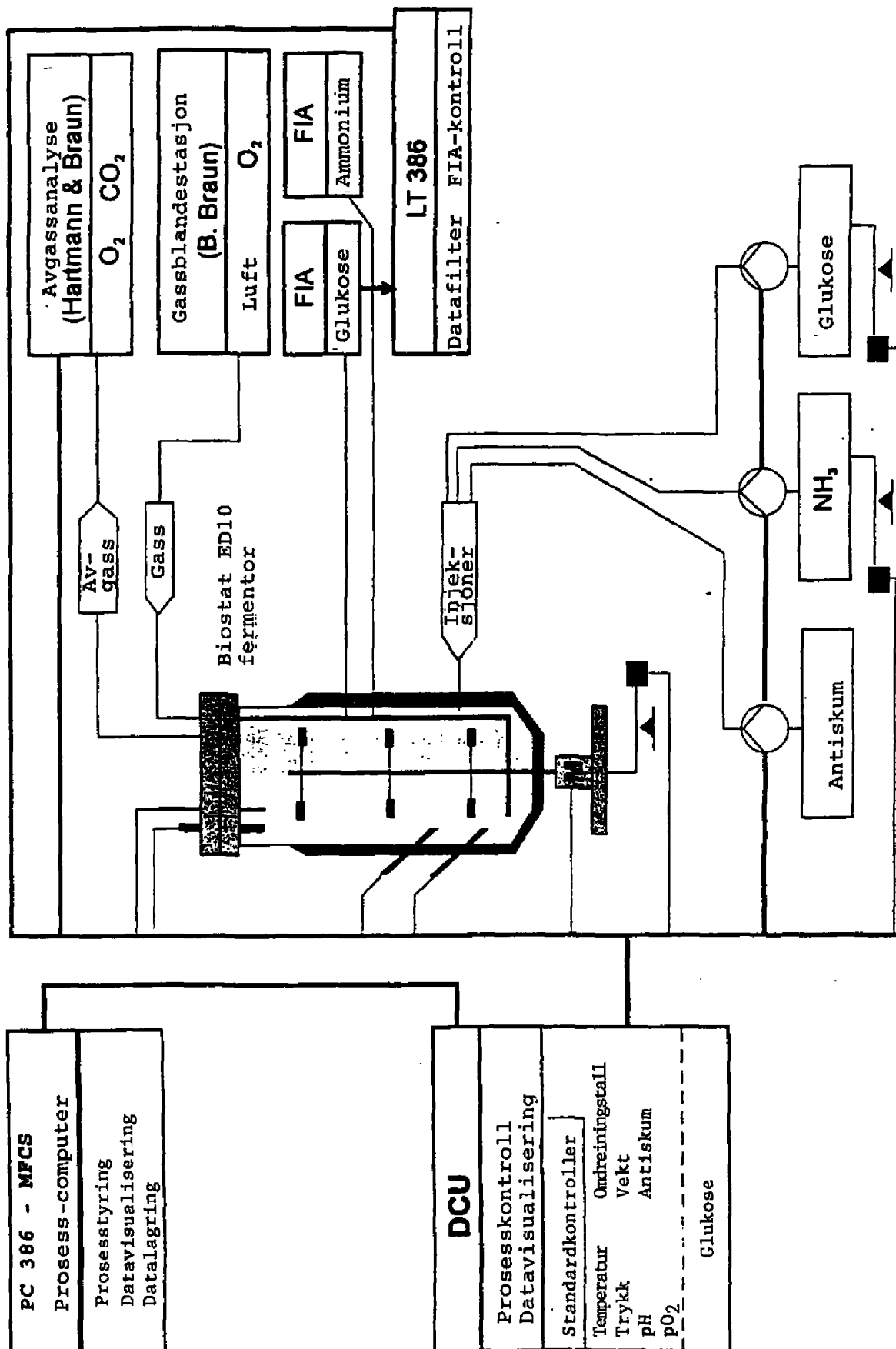


Fig. 2

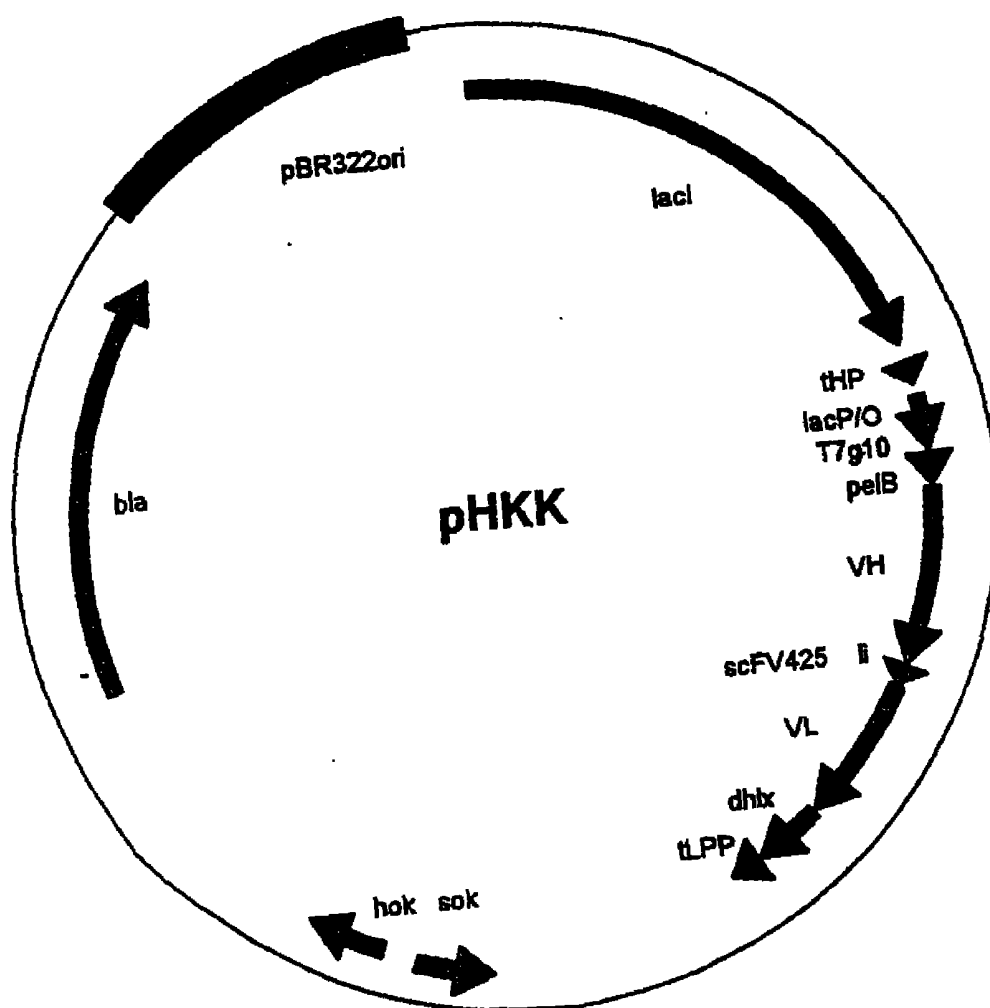


Fig. 3a

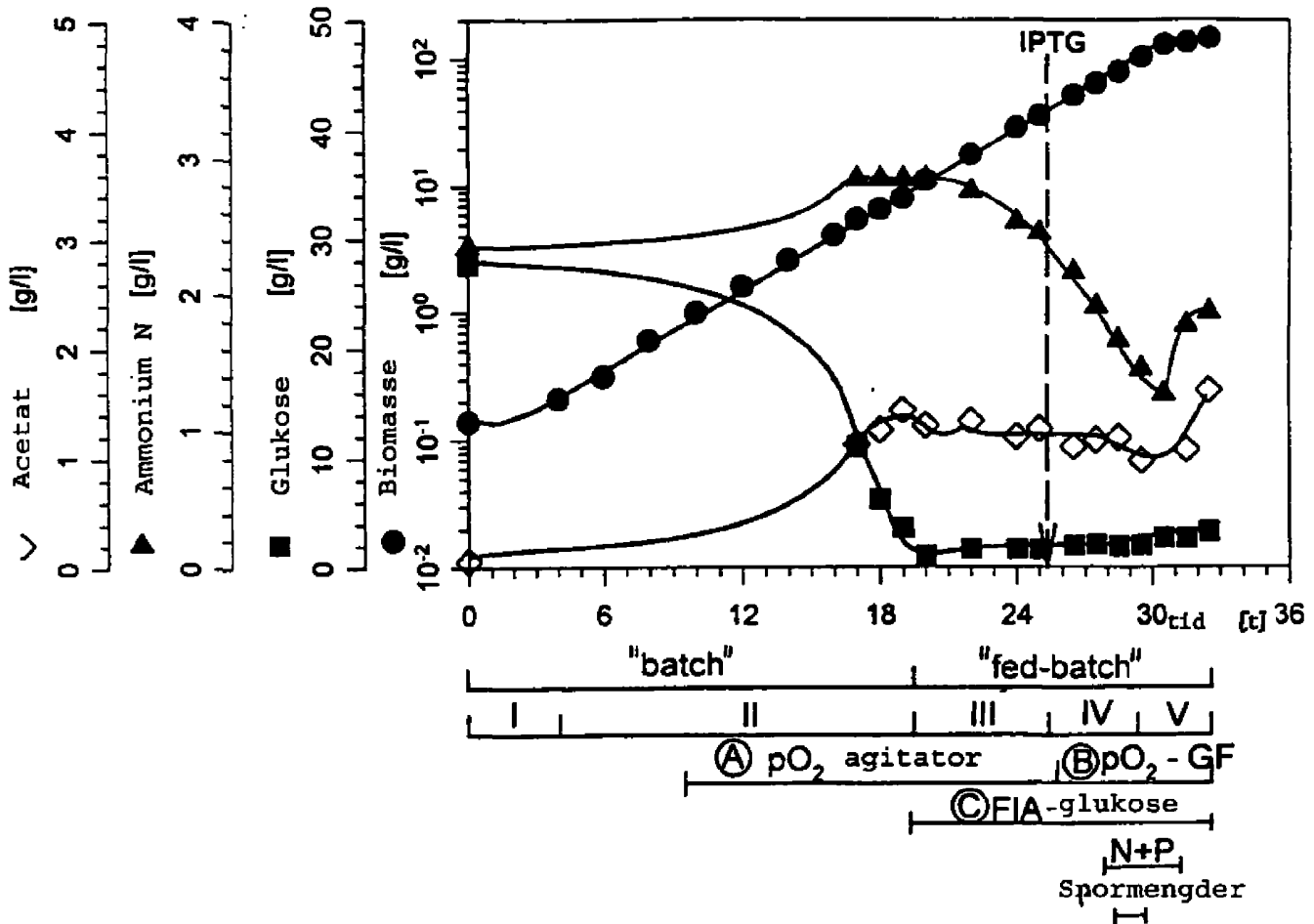


Fig. 3b

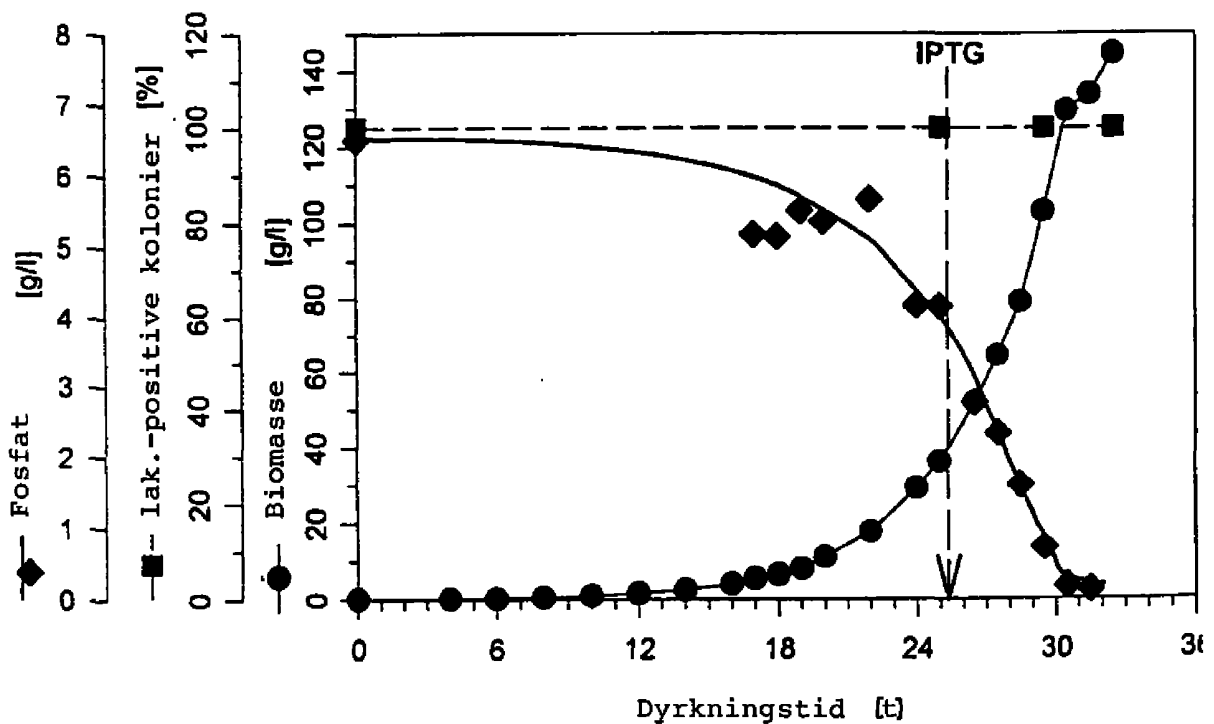


Fig. 3c

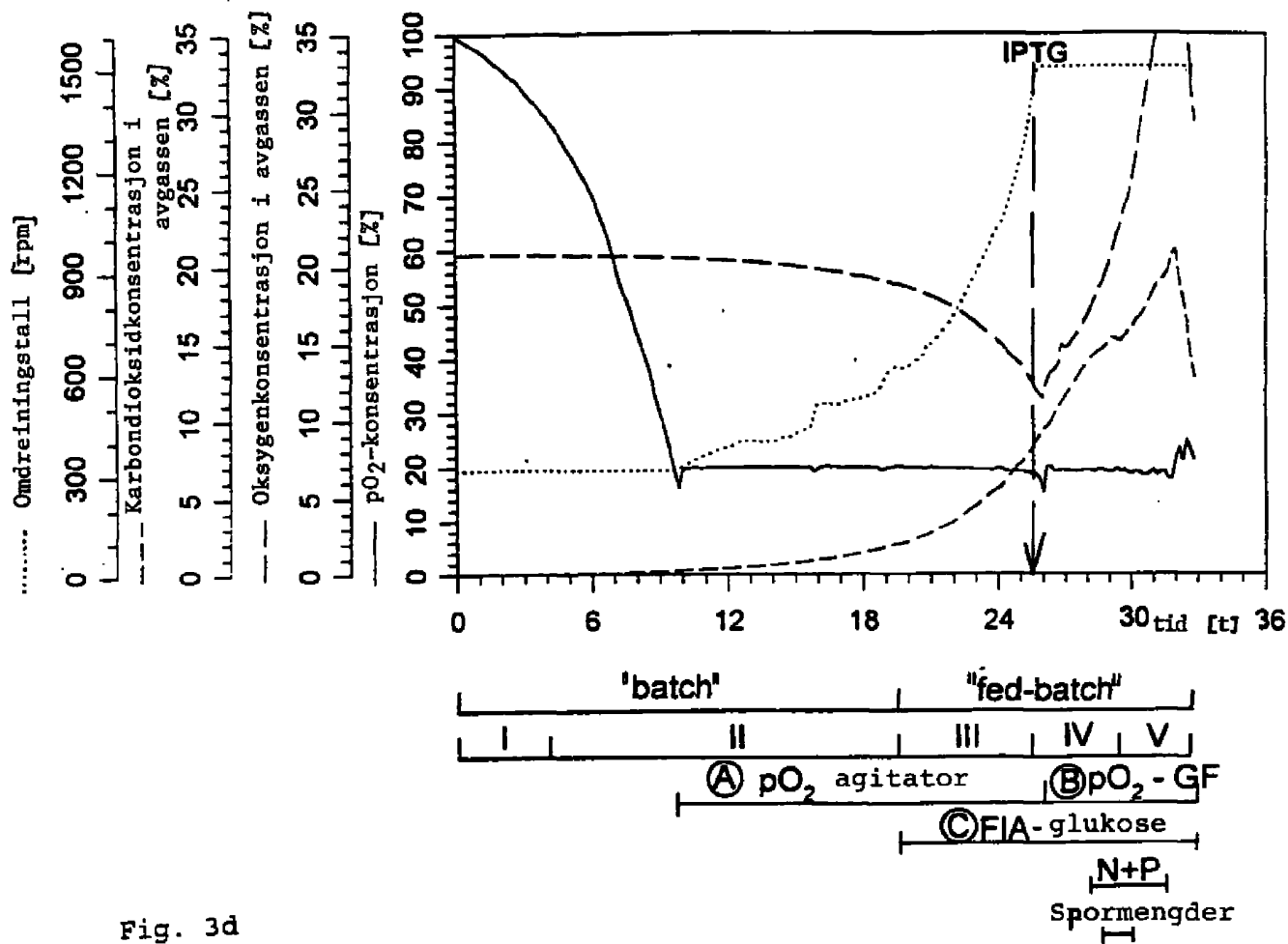


Fig. 3d

