



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **225 243**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 01869**

(22) A bejelentés napja: **2002. 09. 12.**

(51) Int. Cl.: **C12N 9/52** (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

(40) A közzététel napja: **2004. 12. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértésítőben: **2006. 08. 28.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 02/29015

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 03023030**

(30) Elsőbbségi adatok:

60/322,350 **2001. 09. 13.** **US**

(72) Feltaláló:

Joly, John C., San Mateo, Kalifornia (US)

(73) Jogosult:

**Genentech, Inc., South San Francisco,
Kalifornia (US)**

(74) Képviselő:

**Karácsonyi Béla, ADVOPATENT Szabadalmi és
Védjegy Iroda, Budapest**

(54)

Aminopeptidázt kódoló gént tartalmazó Gram-negatív baktériumsejt

(57) Kivonat

A találmány tárgya Gram-negatív baktériumsejt, amely egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányos. A gén szekvenciája legalább 80%-ban azonos egy natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázt kódoló DNS-

molekulával, amely aminopeptidáz a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavait tartalmazza, és aminopeptidázt kódol.

HU 225 243 B1

A találmány bakteriális aminosavakra vonatkozik. Közelebbről, a találmány tárgyát olyan fontos enzimaktivitás képezi, amelynek eltávolítása vagy túlzott mértékű expresszálatása javítja a baktériumokban termelődő hasítatlan, illetve hasított polipeptidek (például rekombináns polipeptidek) kitermelését. Ezen túlmenően a találmány tárgyát Gram-negatív baktériumsejtek képezik, amelyek aminosavakat kódoló kromoszomális génjük vonatkozásában hiányosak.

Bizonyos proteinek N-terminális aminosava – Gram-negatív baktériumokban és archaeobaktériumokban (például *E. coli*-ban) termelődve, a sejtekben lévő aminosavak jelenléte miatt – lehasításra kerül, miáltal a sejtenyészeten (a tenyésztéssel egyidejűleg vagy a tisztítási folyamat részeként alkalmazott sejtfeltérési lépésben) a vad típusú polipeptidhez nagyon hasonló szennyeződés jelenik meg. Gyógyászati célra alkalmazható proteinek termelése esetén ezt a szennyeződést el kell különíteni a vad típusú polipeptidről. Példaként említhető a humán növekedési hormon (hGH), amelynek N-terminális fenil-alaninja – *E. coli*-sejtekben termeltetve – lehasításra kerül. A hGH ezen változata (dez-phe-hGH) a sejtek feltérési során az ép hGH-val (natív hGH) elegyet alkot, és nehéz attól elválasztani. Az elválasztáshoz az elegyet hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának kell alávetni. A termelékenység javítása szempontjából előnyös lenne ezt a plusz tisztítási lépést elhagyni.

Ezen túlmenően bizonyos esetekben olyan polipeptidek előállítására van szükség, amelyekből az N-terminális aminosav le van hasítva, továbbá tisztább hasított változat kinyerése érdekében kívánatos lehet az ilyen polipeptidek mennyiségének natív szekvenciájú polipeptid mennyiségéhez viszonyított arányának növelésére is.

Az ismert *E. coli* aminosavak közül több széles specifikitású, melyek a polipeptidek N-terminálisán többféle aminosav hasítására képesek [például *pepA*, *pepB* és *pepN* („*Escherichia coli* and *Salmonella*”, szerk.: Frederick C. Neidhardt, ASM Press, 62. fejezet. Charles Miller: „Protein Degradation and Proteolytic Modification”, 938–954. old. (1996); Gonzales and Robert-Baudouy, FEMS Microbiology Reviews 18(4), 319–44 (1996)]. Az *E. coli* K–21-törzsben kimutatott, b2324-aminopeptidáz kódoló yfcK-gént az *E. coli* genom szekvenálási projektben „feltételezett peptidázként” azonosították [lásd Blattner és munkatársai: Science 277, 1453 (1997), GenBank nyilvántartási szám: AE000321], enzimaktivitásáról azonban nem írtak le további információkat. A 0157:H7 *E. coli*-törzsben található homológ azonos a K–12-törzs yfcK-génjével. Mindazonáltal szükség van olyan bakteriális aminosavakra, amelyek nagyobb tisztaságú hasított polipeptidek kinyerése céljából manipulálhatók.

Találmányunk kidolgozása során az yfcK-gén által módolt b2324-enzimet aminosavaként, azaz a polipeptidek N-terminális aminosavainak lehasításáért felelős enzimként azonosítottuk, s ez a felismerés szolgál a találmány szerinti megoldás alapjául.

A találmány értelmében a b2324-enzimmel homológ aminosavakat kódoló géneket (ideértve a

b2324-aminopeptidáz kódoló yfcK-gént) eltávolítjuk a Gram-negatív baktériumtörzsekből (például kromoszómájuk génszerkezeti módszerekkel történő szétbontásával), miáltal a hasított szennyezés nem termelődik jelentős mennyiségben, következésképpen az N-terminálison hasított polipeptidszennyezés eltávolításának további tisztítási lépései elhagyhatók. Az így létrehozott törzsek közül legalább egy olyat azonosítottunk, amely a nem hasított polipeptidet ugyanolyan mennyiségben termeli, mint a kiindulási törzsek.

Közelebbről, feltárunk egy Gram-negatív baktériumsejtet, amely egy kromoszomális génje vonatkozásában hiányos, mely gén legalább 80%-ban azonos egy natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz kódoló DNS-molekulával, mely aminosavakat tartalmazza, és aminosavakat kódol. Az ilyen sejtek természetben előforduló megfelelői tartalmazzák a kromoszomális gént, miközben a találmány szerinti sejtek a vad típusú sejt – általában genetikai manipulációval vagy egyéb, tetszőleges módszerek alkalmazásával manipulált – módosított változatai, amelyekben a módosítás eredményeként eliminált vagy működésképtelenné tett gén nem kódol aminosavakat.

A találmány értelmében továbbá olyan Gram-negatív baktériumsejtet tárunk fel, amely egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányos, mely gén a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavakat tartalmazó aminosavszekvenciával összehasonlítva legalább 80% pozitív aminosavat tartalmazó polipeptidet kódoló DNS-t foglal magában, ahol a polipeptid aminosavakat tartalmaz.

Szintén a találmány értelmében olyan Gram-negatív baktériumsejtet tárunk fel, amely egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányos, mely gén szekvenciája legalább 80%-ban azonos a natív yfcK-gén szekvenciájával, amely az 1. azonosító számú szekvencia 1–2067. nukleotidjaiból áll, és aminosavakat kódol.

A találmány egy következő megvalósítási módjának megfelelően *E. coli*-sejtet tárunk fel, amely a kromoszomális, natív szekvenciájú yfcK-gén vonatkozásában hiányos.

A felsorolt sejtek előnyösen legalább egy, proteáz kódoló génre (például *degP* vagy *fhuA*) nézve hiányosak. Ezen túlmenően az ilyen sejtek a sejt szempontjából heterológ polipeptidet, előnyösen eukarióta, még előnyösebben emlőseredetű, legelőnyösebben humán polipeptidet, például humán növekedési hormont kódoló nukleinsavat tartalmazhatnak.

A találmány egy következő megvalósítási módjának megfelelően eljárást tárunk fel heterológ polipeptid előállítására, melynek során (a) találmány szerinti sejteket tenyésztünk; és (b) a sejtekből kinyerjük a polipeptidet. A tenyésztést előnyösen fermentorban végezzük. Egy másik előnyös megvalósítási módszer a polipeptidet a sejt periplazmájából vagy tenyésztő tápközegéből nyerjük ki. Egy további előnyös megvalósítási mód szerint a polipeptid kinyerése céljából a sejtet feltárjuk, s az így kapott lizátumból előnyösen intakt polipeptidet tisztítunk. Egy még előnyösebb megvalósítási módszer a lizátumot a tisztítási lépés előtt inkubálásnak vetjük alá.

A következőkben az ábrák rövid leírását ismer-
tetjük.

Az 1. ábrán a b2324-aminopeptidázt kódoló yfck-
génre nézve deléciós *E. coli* 61G3 gaz-
datörzs származási diagramját mutat-
juk be.

A 2. ábrán a szobahőmérsékleten 0, 15, 24 és
42 óra hosszat inkubált rhGH-extrak-
ciós kontrolltörzs (16C9) folyadékkro-
matográfiás/tömegspektroszkópiás
(LC/MS) analízisével kapott százalé-
kos területeredmények oszlopgrafikon-
ját mutatjuk be. Az oszlopok eltérő sa-
tírozással jelölt szakaszai a natív hGH,
az N-terminális fenil-alanin nélküli hGH
(des-phe), illetve az N-terminális fe-
nil-alanin és prolin nélküli hGH (des-
phe-pro) mennyiségét reprezentálják.

A 3. ábrán a szobahőmérsékleten 0, 15, 24 és
42 óra hosszat inkubált rhGH-törzs
(61G3) folyadékkromatográfiás/tömeg-
spektroszkópiás (LC/MS) analízisével
kapott százalékos területeredmények
oszlopgrafikonját mutatjuk be. Az osz-
lopok eltérő satírozással jelölt szaka-
szai a natív hGH, az N-terminális fe-
nil-alanin nélküli hGH (des-phe), illetve
az N-terminális fenil-alanin és prolin
nélküli hGH (des-phe-pro) mennyisé-
gét reprezentálják.

A 4. ábrán a 37 °C-on 0, 15 és 24 óra hosszat in-
kubált rhGH-extrakciós kontrolltörzs
(16C9) folyadékkromatográfiás/tömeg-
spektroszkópiás (LC/MS) analízisével
kapott százalékos területeredmények
oszlopgrafikonját mutatjuk be. Az osz-
lopok eltérő satírozással jelölt szaka-
szai a natív hGH, az N-terminális fe-
nil-alanin nélküli hGH (des-phe), illetve
az N-terminális fenil-alanin és prolin
nélküli hGH (des-phe-pro) mennyisé-
gét reprezentálják.

Az 5. ábrán a 37 °C-on 0, 15 és 24 óra hosszat in-
kubált rhGH-törzs (61G3) folyadékkro-
matográfiás/tömegspektroszkópiás
(LC/MS) analízisével kapott százalé-
kos területeredmények oszlopgrafikon-
ját mutatjuk be. Az oszlopok eltérő sa-
tírozással jelölt szakaszai a natív hGH,
az N-terminális fenil-alanin nélküli hGH
(des-phe), illetve az N-terminális fe-
nil-alanin és prolin nélküli hGH (des-phe-
pro) mennyiségét reprezentálják.

Definíciók

A leírásban a „sejt”, „sejtvonal”, „törzs” és „sejte-
nyészet” kifejezéseket egymás szinonimáiként alkalmazzuk, és valamennyi ilyen megjelölés magában foglalja az utódokat. Ilyenformán a „transzformáns” és „transzformált sejt” kifejezések jelentése kiterjed az el-

sődleges, eredeti sejtre és a belőle származó tenyészetekre (függetlenül az átoltások számától). Az utódsejtek DNS-tartalmukban nem pontosan egyformák, ami a szándékos vagy véletlenszerű mutációk következménye. A funkciójuk és biológiai aktivitásuk tekintetében az eredetileg transzformált sejttel azonos mutáns utódok szintén e kifejezés jelentéskörébe tartoznak. Eltérő meghatározások esetén az adott kifejezés jelentése a szövegösszefüggésből lesz érthető.

A leírásban a „baktériumok” kifejezésen Gram-negatív baktériumokat értünk, melyek egyik előnyös típusa az Enterobacteriaceae család. Az e családba tartozó baktériumok példáulként említhetők az *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* és *Shigella* fajok. A találmány céljaira alkalmas baktériumok további típusai közé tartoznak az *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* és *Paracoccus* fajok. A találmány szerinti megoldás gyakorlati kivitelezésére alkalmas *E. coli* gazdatörzsek például, többek között, a következők: *E. coli* W3110 (ATCC 27325), *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B és *E. coli* X1776 (ATCC 31537), melyek közül a W3110-törzset alkalmazhatjuk előnyösen. A felsorolt baktériumok bármelyikének mutánsai is alkalmazhatók. A találmány céljaira megfelelő baktérium kiválasztása során természetesen figyelembe kell venni, hogy a replikon az adott baktériumsejtekben replikációra képes-e. Például ha a replikont olyan jól ismert plazmidok „szállítják”, mint a pBR322, pBR325, pACYC177 vagy pKN410, gazdasejtként, alkalmas módon, *E. coli*-, *Serratia*- vagy *Salmonella*-sejtek használhatók fel.

A „kromoszomális yfck-gén” kifejezésen az *E. coli*-genom-szekvenálási projektben „feltételezett peptidáz-ként” azonosított b2324-proteint kódoló gént (Blattner és munkatársai, lásd fentebb; GenBank nyilvántartási száma: AE000321) értjük. A b2324-protein Dayhoff nyilvántartási száma: B65005; SwissProt nyilvántartási száma: P77182; és a gén az *E. coli* 52.59' kromoszómapozícióján helyezkedik el (bázispár-pozíciók: bal oldali végződés: 2439784. bázispár; jobb oldali végződés: 2441790. bázispár). Az yfck-gén nukleotidszekvenciája a következő:

```
TTGCGCAGCCTTACACACATCGCTAAGATCGAGC
CACCGCCTGTAAGACGAGTAACCTTAC
GTGAAACACTACTCCATACAACCTGCCAACCTC-
GAATTTAATGCTGAGGGTACCTGTT
TCCCGAGATTTTGACGATGCTATTTTCCAACGA-
TAACGGGCTGGAAGAGACGCGTTAT
GTTTTTCTGGGAGGCAACCAATTAGAGG-
TACGCTTTCCTGAGCATCCACATCCTCTGTTT
GTGGTAGCAGAGAGCGGCTTCGGCACC GGAT-
TAACTTCCTGACGCTATGGCAGGCATT
GATCAGTTTCGCGAAGCGCATCCGCAAGCGCAAT-
TACAACGCTTACATTTTATTAGTTTT
GAGAAATTTCCCCTCACCCGTGCGGATTTAGCCT-
TAGCGCATCAACACTGGCCGGAAGTG
GCTCCGTGGGCAGAACAACTTCAGGCG-
CAGTGGCCAATGCCCTTGCCCGGTTGCCATCGT
TTATTGCTCGATGAAGGCCGCGTGACGCTGGATT-
TATGTTTGGCGATATTAACGAAGTG
```

ACCAGCCAACTGGACGATTTCGCTAAATCAAAAAG-
 TAGATGCCTGGTTTCTGGACGGCTTT
 GCGCCAGCGAAAAACCCGGATATGTGGACG-
 CAAAATCTGTTTAACGCCATGGCAAGGTTG
 GCGCGTCCGGGCGGCGACGCTGGCGACATT-
 TACGTCTGCCGTTTTGTCCGCCGCGTTTTG
 CAGGACGCCGGATTACGATGCAAAAACG-
 TAAGGGCTTTGGGCGCAAACGGGAAATGCTT
 TGCGGGGTGATGGAACAGACATTACCGCTCC-
 CCTGCTCCGCCCGTGGTTTAACCGCACG
 GGCAGCAGCAAACGGGAAGCGGCGAT-
 TATCGGCGGTGGTATTGCCAGCGCGTTGTTGTCG
 CTGGCGCTATTACGGCGCGGCTGGCAGGTAA-
 CGCTTTATTGCGCGGATGAGGCCCGCGCA
 CTGGGTGCTTCCGGCAATCGCCAGGGGGCGCTG-
 TATCCGTTATTAAGCAAACACGATGAG
 GCGCTAAACCGCTTTTTCTCTAATGCGTT-
 TACTTTTGCTCGTCCGTTTTACGACCAATTA
 CCCGTTAAATTTGATCATGACTGGTGCGGCGT-
 CACGCAGTTAGGCTGGGATGAGAAAAGC
 CAGCATAAAATCGCACAGATGTTGTCAATGGATT-
 TACCCGCAAGCTGGCTGTAGCCGTT
 GAGGCAAATGCGGTTGAACAAATTACGG-
 GCGTTGCGACAAATTGCGAGCGCATTACTTAT
 CCGCAAGGTGGTTGGCTGTGCCAGCAGAACT-
 GACCCGTAATGTGCTGGAACCTGGCGCAA
 CAGCAGGGTTGCGAGTTTATTATCAATATCAGTT
 ACAGAATTTATCCCGTAAGGATGAC
 TGTTGGTTGTTGAATTTGCGAGGATCAGCAAG-
 CAACACACAGCGTAGTGGTACTGGCG
 AACGGGCATCAAATCAGCCGATTTCAGC-
 CAAACGTCGACTCTCCCGGTGATTCCGTTGCC
 GGGCAGGTCAGCCATATTCCGACAACGCCG-
 GAATTGGCAGAGCTGAAGCAGGTGCTGTGC
 TATGACGGTTATCTCACGCCACAAAATCCGGC-
 GAATCAACATCATTGTATTGGTGCCAGT
 TATCATCGCGGCAGCGAAGATACGGCGTACAGTG
 AGGACGATCAGCAGCAGAATCGCCAGC
 GGTTGATTGATTGTTTCCCGCAGGCACAGTGGGC
 AAAAGAGGTTGATGTAGTGATAAAGA
 GGCGCGCTGCGGTGTGCGTTGTGCCACCCGC-
 GATCATCTGCCAATGGTAGGCAATGTTCCC
 GATTATGAGGCAACACTCGTGGAATATGCGTCGT
 GGCGGAGCAGAAAGATGAGGCGGTAA
 GCGCGCGCGGTTTTTGACGATCTCTT-
 TATGTTTGCGGCTTTAGGTTCTCGCGTTTTG
 TGTCTGCCCCGCTGTGTGCCGAGATTCTG-
 GCGGCGCAGATGAGCGACGAACCGATTCCG
 ATGGATGCCAGTACGCTGGCGGCGTTAAACCC-
 GAATCGGTTATGGGTGCGGAAATTGTTG
 AAGGGTAAAGCGTTAAGCGGGGTAA (1. azono-
 sító számú szekvencia); és a fenti nukleotidszekvencia
 által kódolt protein aminosavszekvenciája az alábbi:
 MRSLTHIAKIEPPVRRVTYVKHYSIQPANLEF-
 NAEPTVSRDFDDVYSNDNGLEETRYV
 FLGGNQLEVRFPHPHPLFVVAESGFGT-
 GLNFLTLWQAFDQFREAHPQAQLQLHFISFEK
 FPLTRADLALAHQHWPELAPWAEQL-
 QAQWPMPLPGCHRLLLDEGRVTLDLWFGDI-
 NELTSQ

LDDSLNQKVDWFLDGFAPAKNPDMWTQNLFNA-
 MARLARPGGTATFTSAGFVRRGLQDAG
 FTMQKRKGFGRKREMLCGVMEQTLPLPCS-
 APWFNRTGSSKREAAIIGGGIASALLSLALLR
 5 RGWQVTLYCADEAPALGASGNRQGALYPLLSKH-
 DEALNRFFSNAFTFARRFYDQLPVKFDH
 DWCGVTQLGWDEKSQHKIAQMLSDPLAELAVA-
 VEANAVEQITGVATNCSGITYPQGGWLC
 PAELTRNVLELAQQQGLQIYYQYQLQNLSR-
 10 KDDCWLNFAGDQQATHSVVVLANGHQISR
 SQTSTLPVYSVAGQVSHIPTTPELAELKQVLCYDGYL
 TPQNPANQHHCIGASYHRGSEDTA
 YSEDDQQQNRQRLIDCFPQAQWAKEVDVSD-
 KEARCGVRCATRDHLPMVGNVPDYEATLVEY
 15 ASLAEQKDEAVSAPVFDDLFMFAALGSRGLCSAPLC
 AEILAAQMSDEPIPMDASTLAALNP
 NRLWVRKLLKGKAVKAG (2. azonosító számú szek-
 vencia).

Az adott gén vagy nukleinsav vonatkozásában „hiá-
 nyos” kifejezésen azt értjük, hogy a sejtben a kérdéses
 gén deletálva, inaktíválva vagy más módon működés-
 képtelenné van téve, miáltal az általa kódolt protein
 nem termelődik. Például a b2324-aminopeptidázt kó-
 doló yfck-gén vonatkozásában hiányos sejtek sejtte-
 nyésztés során nem képesek termelni az yfck-gén ter-
 mékét. Hasonlóan, egy proteázt kódoló gén vonatkozá-
 sában deficiens sejt sejtenyésztes során nem termeli a
 szóban forgó proteázt.

A „polipeptid” kifejezésen általában tetszőleges
 sejtől származó, körülbelül tíz aminosavnál hosszabb
 peptideket és proteineket értünk. A „heterológ” polipep-
 tidek az alkalmazott gazdasejt szempontjából idegen
 polipeptidek (például *E. coli*-ban termeltetett humán
 protein). A heterológ polipeptid lehet prokarióta vagy
 35 eukarióta eredetű, azonban előnyösen eukarióta, még
 előnyösebben emlőseredetű, legelőnyösebben humán
 polipeptid.

Az emlőseredetű polipeptidek jellemző példái közé
 tartoznak a következők: renin, növekedési hormon,
 40 mint például a humán növekedési hormon; szarvas-
 marha-eredetű növekedési hormon; növekedési hor-
 mont felszabadító faktor; mellékpajzsmirigy-hormon;
 pajzsmirigy-stimuláló hormon; lipoproteinek; lipoprotei-
 nek; 1-antitripszin; inzulin A-lánc; inzulin B-lánc; proin-
 zulin; trombopoietin; follikuluszstimuláló hormon; kalci-
 45 tonin; luteinizáló hormon; glukagon; vérárvadási fakto-
 rok, például VIIIc faktor, IX. faktor, szöveti faktor és
 von Willebrand-faktor; vérárvadást gátló faktorok, pél-
 dával protein-C; atrialis natriureticus faktor; tüdő szőr-
 50 faktáns; plazminogén aktivátor, például urokináz vagy
 humán vizelet vagy szövet típusú plazminogén aktivá-
 tor (t-pA); bombesin; trombin; vérképzési növekedési
 faktor; tumornekrózis-faktor- α és - β ; enkephalináz;
 55 szérumalbumin, például humán szérumalbumin; mülle-
 rianosist gátló szubsztancia; relaxin A-lánc; relaxin
 B-lánc; prorelaxin; egérszeredetű gonadotropinasszociált
 peptid; mikrobiális protein, például β -laktamáz; DNáz;
 60 inhibin; aktivin; vascularis endothelialis növekedési fak-
 tor (VEGF); hormonok és növekedési faktorok recepto-
 rai; integrin; protein-A vagy -D; reumatoid faktorok;

neurotroph faktor, például agyi eredetű neurotroph faktor (BDNF), neurotrophin-3, -4, -5 vagy -6 (NT-3, NT-4, NT-5 vagy NT-6) vagy idegsejt növekedési faktorok (NGF); cardiotrophinok (szív hipertrófia faktor), például cardiotrophin-1 (CT-1); vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF); fibroblaszteredetű növekedési faktor, például aFGF és bFGF; epidermális növekedési faktor (EGF); transzformáló növekedési faktorok (TGF-ek), például TGF- α és TGF- β , ideértve a TGF-1-et, TGF-2-t, TGF-3-at, TGF-4-et és TGF-5-öt; inzulinszerű növekedési faktor-I és -II (IGF-I és IGF-II); dez(1-3)-IGF-I (agyi IGF-I), inzulinszerű növekedési faktor kötő proteinek; CD-proteinek, például CD-3, CD-4, CD-8 és CD19; eritropoietin (EPO); oszteoinduktív faktorok; immunotoxinok; csont morfogenetikus protein (BMP); interferon, például interferon- α , - β és - γ ; szérumalbumin, például humán szérumalbumin (HSA) vagy szarvasmarha-szérumalbumin (BSA); kolonizációt stimuláló faktorok (CSF-ek), például M-CSF, GM-CSF és G-CSF; interleukinek (IL-ek), például IL-1 – IL-10; anti HER-2 antitest; Apo2-ligandum; szuperoxid dizmutáz; T-sejt-receptorok; felületi membrán-proteinek; lebomlást gyorsító faktor; virális antigének, például HIV-vírus burokproteinjének részlete; transzportproteinek; „homing”-receptorok; adresszinek; szabályozóproteinek; antitestek; valamint a felsorolt polipeptidek fragmensei. A találmány céljaira előnyös polipeptidek közé tartoznak az N-terminális fenil-alanin tartalmazók, mint például a hGH. További előnyös polipeptidek azok, amelyek baktériumok periplazmájában vagy sejtenyésző tápközegében termeltethetők.

A „szabályozószekvencia” kifejezésen olyan DNS-szekvenciát értünk, amely a hozzá működőképesen kapcsolt kódolószekvencia adott gazdaszervezetben történő expresszálatásához szükséges. A bakteriális gazdasejtek számára megfelelő szabályozószekvencia például a promotor, adott esetben az operátor-szekvencia, valamint a riboszómakötő hely.

Egy nukleinsav akkor van „működőképesen kapcsolva”, ha egy másik nukleinsavszekvenciával funkcionális kapcsolatban van. Például egy preszekvencia vagy szekréciós vezetőszekvencia DNS-e akkor van működőképesen egy polipeptidet kódoló DNS-hez kapcsolva, ha olyan preproteinként expresszáldik, amely részt vesz a polipeptid szekréciójában. Egy promotor akkor van működőképesen egy kódolószekvenciához kapcsolva, ha hatást gyakorol a szekvencia transzkripciójára. Egy riboszómakötő hely akkor van működőképesen egy kódolószekvenciához kapcsolva, ha elősegíti a transzlációt. A „működőképesen kapcsolt” kifejezés általában azt jelenti, hogy az összekapcsolt DNS-szekvenciák egymással határosak, illetve – szekréciós vezetőszekvencia esetében – egymással határosak, és azonos leolvasási fázisban vannak. Az összekapcsolás szokványos restrikciós helyeknél ligálással valósulhat meg. Ha ilyen helyek nem léteznek, az általános gyakorlatnak megfelelően szintetikus oligonukleotidadapterek vagy kapcsolószekvenciák alkalmazhatók.

A gének vagy nukleinsavak vonatkozásában a „túlzott mértékű expresszió” kifejezésen specifikus protei-

nek olyan mennyiségben történő szintézisét értjük, amely nagyobb, mint a sejt által a szintézis mesterséges indukciója nélkül termelt proteinmennyiség, például promotor alkalmazásával.

Egy polipeptid „kinyerése” kifejezésen általában a polipeptidnek a polipeptidet termelő sejtektől elválasztott formában történő előállítását értjük.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, a „b2324-aminopeptidáz-polipeptid”, „b2324-aminopeptidáz-protein” vagy „b2324-aminopeptidáz” kifejezésen natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázt és b2324-aminopeptidáz-homológokat értünk. A b2324-aminopeptidáz polipeptidek, a szövegösszefüggéstől függően, különböző forrásokból (például baktériumsejtekből) izolálhatók, illetve rekombináns és/vagy szintézises módszerekkel állíthatók elő.

A „natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz” kifejezésen olyan polipeptidet értünk, amely a természetben előforduló b2324-aminopeptidázéval azonos aminosav-szekvenciát tartalmaz. A natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz természetes forrásból izolálható, vagy rekombináns és/vagy szintézises módszerekkel állítható elő. A „natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz” kifejezés jelentése kiterjed a b2324-aminopeptidáz természetben előforduló, lerövidített vagy szekretált alakjaira (például extracelluláris domén szekvencia), természetben előforduló változataira (például alternatív „*splicing*” eredményeként létrejött alakok) és természetben előforduló allélváltozataira. A találmány egyik megvalósítási módja értelmében a natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz olyan érett vagy teljes hosszúságú, natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz, amely a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavait tartalmazza.

A „b2324-aminopeptidáz-homológ” kifejezés olyan aminopeptidázra vonatkozik, amelynek aminosavszekvenciája legalább 80%-ban azonos a 2. azonosító számú szekvenciát tartalmazó b2324-aminopeptidáz 1–688. aminosavaiból álló szekvenciával. A b2324-aminopeptidáz-homológok közé tartoznak például azok a b2324-aminopeptidáz-polipeptidek, amelyek a 2. azonosító számú aminosavszekvencia N- vagy C-terminális végén (vagy egy vagy több belső doménben) egy vagy több hozzáadott aminosavat tartalmaznak, vagy egy vagy több aminosavuk deletálva van. A b2324-aminopeptidáz-homológ előnyösen legalább 85%-ban, előnyösebben legalább kb. 90%-ban, még előnyösebben legalább kb. 95%-ban azonos a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavaiból álló szekvenciával. A homológok nem tartalmaznak natív szekvenciát.

Az „yfcK-gén” kifejezés olyan génre vonatkozik, amely legalább 80%-os szekvenciaazonosságot mutat a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavaiból álló, natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázt kódoló DNS-molekula szekvenciájával, és aminopeptidázt kódol. Az yfcK-gének közé tartoznak azok a gének is, amelyek legalább 80%-ban azonosak az 1. azonosító számú szekvencia egészét tartalmazó kromoszomális yfcK-génnel, és aminopeptidázt kódolnak. Az

ilyen yfck-gének közé tartozik például az a kromoszomális yfck-gén, amely az 1. azonosító számú szekvencia 5'- vagy 3'-végén (vagy egy belső szakaszában) egy vagy több hozzáadott nukleotidot tartalmaznak (vagy egy vagy több nukleotid deletálva van). Az yfck-gén előnyösen legalább kb. 85%-os, előnyösebben legalább kb. 90%-os, még előnyösebben legalább kb. 95%-os szekvenciaazonosságot mutat az 1. azonosító számú szekvencia 1–2067. nukleotidjaiból álló nukleotidszekvenciával. Az „yfck-gén” kifejezés magában foglalja a natív szekvenciájú yfck-gént (azaz a kromoszomális yfck-gént) is.

A találmány leírásában a b2324-aminopeptidáz szekvenciáinak vonatkozásában megadott „százalékos aminosavszekvencia-azonosság” úgy definiálható, mint egy kiszemelt szekvencia azon aminosavainak százalékos aránya, amelyek azonosak a b2324-aminopeptidáz aminosavaival [a két szekvencia megfelelő egymás alá rendezése („alignment”) és szükség esetén – a maximális százalékos azonosság biztosítása érdekében – hézagok beiktatása után], és figyelmen kívül hagyva az esetleges konzervatív szubsztitúciókat. Az általunk megadott százalékos szekvenciaazonossági értékek a WU-BLAST-2 program alkalmazásával generálhatók [Altschul és munkatársai: *Methods in Enzymology* 266, 460 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>]. A WU-BLAST-2 program több keresőparaméter felhasználásával működik, melyek legtöbbje alapértelmezett beállítású. A változtatható paraméterek a következő értékekre vannak beállítva: átfedési távolság=1; átfedési hányad=0,125; szóküszöb (T)=11. A HSP S és HSP S2 paraméterek dinamikus értékek, melyeket a program maga állapít meg (az adott szekvencia összetételétől és azon adatbázis összetételétől függően, amellyel szemben a kérdéses szekvencia összehasonlítási analízisét végezzük, azonban ezek az értékek az érzékenység növelése irányában is beállíthatók). A százalékos aminosavszekvencia-azonossági értéket úgy határozzuk meg, hogy a megegyező aminosavak számát elosztjuk az egymás alá rendezett régióban lévő „hosszabb” szekvencia aminosavainak számával. Azt tekintjük „hosszabb” szekvenciának, amely az egymás alá rendezett régióban a leginkább valószínű aminosavakat tartalmazza (a WU-Blast-2 programmal beiktatott hézagokat figyelmen kívül hagyva).

A fentiek szerint végzett szekvencia-összehasonlítások vonatkozásában a „pozitív aminosav” kifejezés az összehasonlított szekvenciák azon aminosavaira vonatkozik, amelyek nem azonosak, mégis hasonló tulajdonságúak (például konzervatív szubsztitúciók eredményeként). A pozitív aminosavak százalékos arányát a BLOSUM 62 mátrixban pozitív értékkel pontozott aminosavaknak a hosszabb szekvenciában lévő aminosavak összes számához viszonyított aránya határozza meg.

Hasonló módon, a b2324-aminopeptidáz-polipeptid kódolószekvenciáját illetően, a „százalékos nukleinsavszekvencia-azonosság” úgy definiálható, mint egy kiszemelt szekvencia azon nukleotidjainak százalékos aránya, amelyek azonosak a b2324-aminopepti-

dáz kódolószekvenciájában lévő nukleotidokkal. Ezek az azonossági értékek a WU-BLAST-2 – alapértelmezett paraméterekre beállított – BLASTN-moduljával számíthatók ki (átfedési távolság=1; átfedési hányad=0,125).

A találmány szerinti polipeptidekkel összefüggésben alkalmazott „izolált” kifejezés olyan polipeptidre vonatkozik, amely egy – természetes környezetében megtalálható – komponenstől el van választva és/vagy különítve. A természetes környezetben megtalálható szennyező komponensek olyan anyagok, amelyek a polipeptid diagnosztikai vagy gyógyászati felhasználását akadályoznák; az ilyen komponensek közé tartoznak az enzimek, hormonok és egy – proteinszerű vagy nem proteinszerű – oldott anyagok. A találmány előnyös megvalósítási módjai értelmében a polipeptid tisztításának mértéke a következő: (1) forgócsészés („*spinning cup*”) szekvenátor alkalmazásával legalább 15 aminosavas N-terminális vagy belső aminosavszekvencia kinyeréséhez szükséges tisztaság; vagy (2) redukáló vagy nem redukáló feltételekkel (Coomassie-kék vagy előnyösen ezüsfestés alkalmazásával) végzett SDS-PAGE-analízissel homogenitásnak megfelelő tisztaság. Az izolált polipeptid kifejezés jelentése kiterjed a rekombináns sejtekben *in situ* megtalálható polipeptidekre, mivel az ilyen sejtekben a b2324-aminopeptidáz természetes környezetének legalább egy komponense hiányzik. Mindazonáltal az izolált polipeptideket általában legalább egy tisztítási lépést követően kapjuk.

A b2324-aminopeptidáz-polipeptidet kódoló „izolált” nukleinsavmolekula kifejezés a b2324-aminopeptidáz kódoló nukleinsav természetes forrására általánosan jellemző legalább egy szennyező nukleinsavmolekulától elválasztott és azonosított nukleinsavmolekulára vonatkozik. Egy b2324-aminopeptidáz kódoló, izolált nukleinsavmolekula nem azonos a természetben megtalálható alakjával, így az izolált nukleinsavak megkülönböztethetők a természetes sejtekben létező, b2324-aminopeptidáz kódoló nukleinsavmolekuláktól. Mindazonáltal a b2324-aminopeptidáz-polipeptideket kódoló, izolált nukleinsavak közé tartoznak azok a b2324-aminopeptidáz kódoló nukleinsavmolekulák is, amelyek a b2324-aminopeptidáz normális esetben expresszáló sejtekben vannak jelen, azonban a természetes sejtekre jellemzőtől eltérő kromoszomális pozícióban helyezkednek el.

A találmány kiviteli alakjai

A találmány egyik szempontjának megfelelően olyan bakteriális gazdasejttörzseket tárunk fel, amelyekből hiányzik egy aminopeptidáz (amely a polipeptid N-terminális végén elhelyezkedő aminosav lehasításaért felelős enzim, például egy N-terminális fenil-alanin és a vele szomszédos aminosav közötti kötést hasító enzim), ami a polipeptid hatékonyabb tisztítását teszi lehetővé.

Közelebbről, Gram-negatív baktériumsejteket tárunk fel, amelyek egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányosak (mely gén az ilyen sejtek vad típusú

változataiban nem hiányos), mely gén legalább 80%-ban azonos egy natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázt kódoló DNS-molekulával, mely aminopeptidáz a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavait tartalmazza, és aminopeptidázt kódol. Ilyenformán az ilyen gén szekvenciája legalább 80%-ban azonos a – natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázt kódoló – yfcK-gén szekvenciájával. Ez a szekvenciaazonosság előnyösen legalább kb. 85%-os, előnyösebben legalább kb. 90%-os, még előnyösebben legalább kb. 95%-os, legegélyősebben 100%-os.

A találmány egy további kiviteli alakja értelmében olyan Gram-negatív baktériumsejteket tárunk fel, amelyek egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányosak (mely gén az ilyen sejtek vad típusú változataiban nem hiányos), mely gén olyan aminosavszekvenciát kódol, amely a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavaihoz álló, natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázal legalább 80%-os szekvenciaazonosságot mutat, amely előnyösen legalább kb. 85%-os, előnyösebben legalább kb. 90%-os, még előnyösebben legalább kb. 95%-os. A szóban forgó sejtek közé tartoznak a natív szekvenciájú, kromoszomális yfcK-gén vonatkozásában deficiens sejtek.

A találmány egy harmadik szempontjának megfelelően Gram-negatív baktériumsejteket tárunk fel, amelyek egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányosak (mely gén az ilyen sejtek vad típusú változataiban nem hiányos), mely gén a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavait tartalmazó, natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz aminosavszekvenciájával összehasonlítva legalább 80% pozitív aminosavat tartalmazó poliipeptidet (aminopeptidázt) kódoló DNS-t foglal magában. A szóban forgó sejtek közé tartoznak azok a sejtek, amelyek olyan gén vonatkozásában hiányosak, mely gén a natív szekvenciájú b2324-aminopeptidáz aminosavszekvenciájával összehasonlítva 100% pozitív aminosavat tartalmazó poliipeptidet (aminopeptidázt) kódoló DNS-t tartalmaz.

A találmány szerinti megoldás e szempontja szerinti sejtek Gram-negatív baktériumok (például *Salmonella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Caulobacter*, *Agrobacterium*, *Vibrio*, stb.), melyek genomja szekvenálással fel van térképezve, és amelyekben megjósolható egy yfcK-homológ jelenléte. Még előnyösebben, a szóban forgó sejt *Salmonella* nemzetségbe vagy *Enterobacteriaceae* családba tartozó sejt, még előnyösebben *E. coli*-sejt, legelőnyösebben *E. coli* W3110-törzsbe tartozó sejt.

A találmány szerinti sejt adott esetben a sejt vad típusaiban jelen lévő egy vagy több egyéb kromoszomális gén (például bakteriális proteázokat kódoló gének) vonatkozásában is hiányos lehet. Jól ismertek a proteázokban, illetve a proteázokat szabályozó génekben hiányos *E. coli*-törzsek [lásd például a WO 88/05821 számú nemzetközi közzétételi iratot (1988. 08. 11.); Chaudhury és Smith: *J. Bacteriol.* 160, 788–791 (1984); Elish és munkatársai: *J. Gen. Microbiol.* 134, 1355–1364 (1988); Baneyx és Georgiou: „*Expression of proteolytically sensitive polypeptides in Escherichia coli*” In: „Sta-

bility of Protein Pharmaceuticals", 3. kötet, szerk.: Ahern és Manning, 69–108. old., Plenum Press, New York, (1992)].

Az ilyen proteázhiányos törzsek némelyikét proteolízisre érzékeny (és elsősorban gyógyászati és kereskedelmi szempontból fontos) peptidek hatékony előállítására kidolgozása során alkalmazták. Az 5 508 192 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban több proteázhiányos és/vagy hőszokproteinhiányos bakteriális gazdasejt létrehozását tarták fel. Az ilyen gazdasejtek közé egyszeresen, kétszeresen, háromszorosan, illetve négyszeresen proteázhiányos baktériumok és az egy proteázt tartalmazó baktériumok tartoznak, amelyek az rpoH-génben is hordoznak mutációt. 10 A feltárt proteázgének példái közé tartoznak a következők: depP ompT ptr3, prc (tsp) és egy degP rpoH törzs, amelyről leírták, hogy *E. coli*-sejtekben a rekombináns proteinek nagyobb mennyiségű termelődését teszi lehetővé. Park és munkatársai [Biotechnol. Prog. 15, 164 (1999)] leírták, hogy a két sejtburokproteáz génje (degP prc) vonatkozásában hiányos HM114-törzs valamivel gyorsabban szaporodott és több fúziós proteint termelt, mint az egyéb – több proteáz tekintetében hiányos – törzsek. A találmány szerinti sejtek az említett proteázgének 25 közül egy vagy több vonatkozásában lehetnek hiányosak, mely proteázgének közül a következők előnyösek: a proteáz-III-at kódoló kromoszomális ptr3-gén, OmpT-proteázt kódoló kromoszomális ompT-gén és/vagy DegP-proteázt kódoló degP-gén. A törzsek a tonA- (fhuA-), phoA- és/vagy deoC-génekre nézve is hiányosak lehetnek. A találmány szerinti sejt a degP- és/vagy az fhuA-génre nézve hiányos, még előnyösebben genotípusa a következő: W3110 $\Delta fhuA\Delta(argF-lac)169 phoA\Delta E15 deoC2 degP::kanR ilvG2096 \Delta yfcK$. 30 A találmány egy következő kiviteli alakja a találmány szerinti sejt számára heterológ polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz. Az ilyen nukleinsav bármely alkalmas módszerrel bejuttatható a sejtbe, előnyösen – rekombináns expressziós vektor vagy homolog rekombináció alkalmazásával végzett – transzformációval, legelőnyösebben vektorral végzett transzformációval. 35 40

A találmány céljaira alkalmas heterológ polipeptid-
dek közé tartoznak a fentebb megadottak, valamint
azon proteinek és polipeptidek, amelyek első amino-
savként metionint, második aminosavként pedig fe-
nil-alanint tartalmaznak, továbbá azok, amelyek első
aminosavként fenil-alanint tartalmaznak (vagyis azok,
amelyek érett alakjukban kezdőaminosavként fenil-ala-
nint tartalmaznak; amelyekről a kezdő metionin proteo-
litikus érési folyamat eredményeként lehasításra kerül;
és olyan pre-pro-proteinek, amelyekről a szignálpeptid
lehasítása következtében az érett protein N-termináli-
sán fenil-alanin van jelen, mint például a humán növe-
kedési hormon esetében). Ennek megfelelően hetero-
lóg polipeptidként bármely olyan polipeptid alkalmaz-
ható, amely heterológ a termeltetésére alkalmazott
baktériumsejt számára, ha az érett alak vagy végter-
mék N-terminálisán fenil-alanin található.

A fenil-alanin elhelyezkedésével szemben támasz-
60 tott követelménynek megfelelő humán polipeptidek pél-

dái a következők: kollagén alfa-2-lánc prekursor, T-sejt-felületi glikoprotein cd3-delta-lánc prekursor, inzulinprekursor, integrin alfa-3 prekursor, integrin alfa-5 prekursor, integrin alfa-6 prekursor, integrin alfa-7 prekursor, integrin alfa-e prekursor, integrin alfa-m prekursor, integrin alfa-v prekursor, integrin alfa-x prekursor, foszfátidil-kolin-szterol acil-transzferáz-prekursor, limfocita-funkcióval asszociált antigén-3 prekursora, interstitialis kollagenáz prekursora, neutrophil kollagenáz prekursora, motilinprekursor, neuropilin-1-prekursor, vérlemezke-aktiváló faktor acetil-hidroláz-prekursor, csontszialoprotein-II prekursor, növekedési hormon változat prekursor [Seeburg: DNA 1, 239–249 (1982)], szomatotropinprekursor, kisméretű, indukálható a13-citokin-prekursor, kisméretű, indukálható a27-citokin-prekursor, kisméretű, indukálható b11-citokin-prekursor, tumornekrózisfaktor-receptor főcsalád 8. tagjának prekursora, thyrotropin béta-láncának prekursora, vascularis endothelialis növekedési faktor-c prekursora, pre-pro-inzulin (lásd BE 885196-A), HGH-V humán növekedési hormon változat (lásd EP 89666-A), humán proinzulin (lásd 4 431 740 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), AP-szignálpeptid és humán növekedési hormon (hGH), melyet a pAP-1-gén kódol (lásd EP 177343-A), humán növekedési hormon (hGF) prekursora (lásd EP 245138-A), humán BMP (lásd EP 409472-A), humán LFA-3 (CD58) protein (lásd DE 4008354-A), humán II. típusú interleukin-1-receptor (lásd EP 460846-A), csökkentett nephrotoxicitású aprotininanalóg-6 (lásd WO 92/06111-A), csökkentett nephrotoxicitású aprotininanalóg-7 (lásd WO 92/06111-A), csökkentett nephrotoxicitású aprotininanalóg-8 (lásd WO 92/06111-A), csökkentett nephrotoxicitású aprotininanalóg-10 (lásd WO 92/06111-A), csökkentett nephrotoxicitású aprotininanalóg-9 (WO 92/06111-A), csökkent nephrotoxicitású aprotininanalóg-11 (WO 92/06111-A), csökkent nephrotoxicitású aprotininanalóg-12 (WO 92/06111-A), csökkent nephrotoxicitású aprotininanalóg-13 (WO 92/06111-A), csökkentett nephrotoxicitású aprotininanalóg-14 (WO 92/06111-A), alfa-6A integrin alegység (WO 92/19647-A), alfa-6B integrin alegység (WO 92/19647-A), humán LFA-3-protein (EP 517174-A), humán plazma karboxi-peptidáz-B (US 5206161-A), limfoblasztoid eredetű IL-1R (WO 93/19777-A), humán LFA-3 (JP06157334-A), limfocitaaktiválással indukált humán receptor (ILA; CA2108401-A), endothelsejt-protein-receptor (WO 96/05303-A1), humán lecitin-koleszterin acil-transzferáz (LCAT; WO 97/17434-A2), humán oldható CD30-antigén (DE 9219038-U1), humán kisméretű CCN-szerű növekedési faktor (WO 96/39486-A1), humán plazma karboxi-peptidáz-B (US 5593674-A), humán növekedési hormon (WO 98/20035-A1), pKFN-864-plazmidfragmens által kódolt inzulinanalóg (EP861851-A1), főemlős-eredetű CXC-kemokin „IBICK” polipeptid (WO 98/32858-A2), humán kisméretű CCN-szerű növekedési faktor (US5780263-A), humán plazma hialuronidáz (hphAse) aminosavszekvenciája (WO9816655-A1), humán II. típusú IL-1R-protein (US5767064-A), Homo sapiens CC365_40 klón protein (WO 98/07859-A2), hu-

mán növekedési hormon (US5955346-A), humán oldható növekedési hormon receptor (US5955346-A), humán CD30-antigén-protein (WO 99/40187-A1), humán neuropilin-1 (WO 99/29858-A1), humán agyszövet-eredetű polipeptid (OMB096-klón; WO 99/33873-A1), humán PRO285 Toll-protein (WO 99/20756-A2), humán szekretált peptid aminosavszekvenciája (WO 99/11293-A1), humán szekretált protein aminosavszekvenciája (WO 99/07891-A1), humán plazma karboxi-peptidáz-B (PCPB) thr147 (WO 98/55645-A1), humán MIG-béta kemokin-protein (EP887409-A1), humán szekréciós protein aminosavszekvenciája (WO 2000/52151-A2), pWRG1630-plazmid által kódolt humán hGH/EGF fúziós protein (US6090790-A), 3470865-ös cDNS-klón által kódolt humán szekretált protein (WO 2000/37634-A2), humán monocitaeredetű FDF03Delta™-protein (WO 2000/40721-A1), humán monocitaeredetű FDF03-S1-protein (WO 2000/40721-A1), humán monocitaeredetű FDF03-M14-protein (WO 2000/40721-A1), monocitaeredetű FDF03-S2-protein (WO 2000/40721-A1), humán szekretált protein-2 (EP1033401-A2), humán vascularis endothelialis növekedési faktor-C pre-pro-alakja (WO 2000/21560-A1), humán membrántranszport-protein (MTRP-15; WO 2000/26245-A2), humán vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF)-C protein (WO 2000/24412-A2), humán TANGO-191 (WO 2000/18800-A1), HKA92 interferonreceptor (WO 99/62934-A1), humán alfa-10 integrin alegység (WO 99/51639-A1), humán alfa-10 integrin alegység „splice” változata (WO 99/51639-A1), humán delta-1-pirrolin-5-karboxilát reduktáz homológ (P5CRH; US6268192-B1), humán növekedési/differenciálódási faktor-6-szerű protein (AMF10; WO 01/74897-A2), humán transzporter és ioncsatorna-6 (TRICH-6)-protein (WO 01/62923-A2), humán transzporter és ioncsatorna-7 (TRICH7)-protein (WO 01/62923-A2), humán mátrix metalloproteináz-1 (MMP-1)-protein (WO 01/66766-A2), humán mátrix metalloproteináz-8 (MMP-8)-protein (WO 01/66766-A2), humán mátrix metalloproteináz-18P (MMP-18P)-protein (WO 01/66766-A2), humán G-proteinhez kapcsolt receptor-6 (GPCR6)-protein (WO 01/81378-A2), humán Zlec1-protein (WO 01/66749-A2), humán mátrix metalloproteináz (MMP)-szerű protein (WO 01/57255-A1), humán 15. gén által kódolt szekretált HFXDI56-protein (WO 01/54708-A1), humán 9. gén által kódolt szekretált HTEGF16-protein (WO 01/54708-A1), humán szekretált protein-4 (SECP) (WO 01/51636-A2), humán 20. gén által kódolt szekretált HUSIB13-protein (WO 01/51504-A1), humán 28. gén által kódolt szekretált HISAQ04-protein (WO 01/51504-A1), humán 35. gén által kódolt szekretált HCNAH57-protein (WO 01/51504-A1), humán 17. gén által kódolt szekretált HBMCF37-protein (WO 01/51504-A1), humán tumornekrózis-faktor (TNF) által stimulált gén-6 (TSG-6)-protein (US6210905-B1), FCTR10 (WO200146231-A2), humán 18. gén által kódolt szekretált HFKHW50-protein (WO200136440-A1), humán 13. gén által kódolt szekretált HE8FC45-protein (WO 00/77022-A1), humán 32. gén által kódolt szekre-

tált HTLIF12-protein (WO 00/77022-A1), humán 4. gén által kódolt szekretált HCRPV17-protein (WO 01/34643-A1), humán 23. gén által kódolt szekretált HE80K73-protein (WO 01/34643-A1), humán 4. gén által kódolt szekretált HCRPV17-protein (WO 01/34643-A1), humán 22. gén által kódolt szekretált HMSFK67-protein (WO 01/32676-A1), humán 22. gén által kódolt szekretált HMSFK67-protein (WO 01/32676-A1), humán 19. gén által kódolt szekretált HCRNF14-protein (WO 01/34800-A1), humán 6. gén által kódolt szekretált HNEEB45-protein (WO 01/32687-A1), humán 9. gén által kódolt szekretált HHPDV90-protein (WO 01/32675-A1), humán 1. gén által kódolt szekretált B7-H6-protein (WO 01/34768-A2), humán 3. gén által kódolt szekretált HDPMS12-protein (WO 01/34768-A2), humán 13. gén által kódolt szekretált HRABS65-protein (WO 01/34768-A2), humán 1. gén által kódolt szekretált HDPAP35-protein (WO 01/34768-A2), humán 3. gén által kódolt szekretált HDPMS12-protein (WO 01/34768-A2), humán 17. gén által kódolt szekretált HACCL63-protein (WO 01/34769-A2), humán 10. gén által kódolt szekretált HHEPJ23-protein (WO 01/34629-A1), humán 5. gén által kódolt szekretált HE9QN39-protein (WO 01/34626-A1), humán 14. gén által kódolt szekretált HCRN087-protein; 104. azonosító számú szekvencia (WO 01/34626-A1), humán 5. gén által kódolt szekretált HE9QN39-protein (WO 01/34626-A1), humán 14. gén által kódolt szekretált HCRN087-protein (145. azonosító számú szekvencia) (WO 01/34626-A1), humán 4. gén által kódolt szekretált HSODE04-protein (WO 01/34623-A1), humán 6. gén által kódolt szekretált HMZMF54-protein (WO 01/34623-A1), humán 18. gén által kódolt szekretált HPJAP43-protein (WO 01/34623-A1), humán 27. gén által kódolt szekretált HNTSL47-protein (WO 01/34623-A1), humán 27. gén által kódolt szekretált HNTSL47-protein (WO 01/34623-A1), humán 21. gén által kódolt szekretált HLJEA01-protein (WO 01/34767-A2), humán 25. gén által kódolt szekretált HTJNX29-protein (115. azonosító számú szekvencia) (WO 01/34627-A1), humán 25. gén által kódolt szekretált HTJNX29-protein (165. azonosító számú szekvencia) (WO 01/34627-A1), humán TANGO-509 aminosavszekvencia (WO 01/21631-A2), humán TANGO-210-protein (WO 01/18016-A1), humán rákkal összefüggő protein-12 (WO 01/18014-A1), humán rákkal összefüggő protein-18 (WO 01/18014-A1), humán B7-4 szekretált (B7-4S)-protein (WO 01/14557-A1), humán B7-4 membránkötött (B7-4M)-protein (WO 01/14557-A1), humán B7-4 szekretált (B7-4S)-protein (WO 01/14556-A1), humán B7-4 membránkötött (B7-4M)-protein (WO 01/14556-A1), humán DNAX 80 interleukin-változat (WO 01/09176-A2), humán lecitin-koleszterin acil-transzferáz (LCAT; WO 01/05943-A2), humán PR01419-poli-peptid aminosavszekvenciája (WO 00/77037-A2), humán alfa-11 integrinlánc aminosavszekvenciája (WO 00/75187-A1), humán A259 (WO 00/73339-A1), humán csontvelő-eredetű peptid (WO 01/66558-A1), humán tumorasszociált antigénhatású

169 (TAT169)-célprotein (WO 02/16602-A2), humán 3. gén által kódolt szekretált HKZA035ID-protein (WO 02/18411-A1), humán 3. gén által kódolt szekretált HKZA035-protein (WO 02/18411-A1), humán 11. gén által kódolt szekretált HLYCK27-protein (WO 02/18435-A1), humán INTG-1-protein (WO 02/12339-A2), humán 15. gén által kódolt szekretált HFPHA80-protein (70. azonosító számú szekvencia) (WO 02/16390-A1), humán 15. gén által kódolt szekretált HFPHA80-protein (94. azonosító számú szekvencia) (WO 02/16390-A1), humán 2. gén által kódolt szekretált HDQFU73-protein (69. azonosító számú szekvencia) (WO 02/24719-A1), humán 8. gén által kódolt szekretált HDPTC31-protein, 75. azonosító számú szekvencia (WO 02/24719-A1), humán gene 2. gén által kódolt szekretált HDQFU73-protein, 90. azonosító számú szekvencia (WO 02/24719-A1), humán 6. gén által kódolt szekretált HDPRJ60-protein, 95. azonosító számú szekvencia (WO 02/24719-A1), humán 8. gén által kódolt szekretált HDPTC31-protein, 99. azonosító számú szekvencia (WO 02/24719-A1), humán 8. gén által kódolt szekretált HDPTC31-protein, 100. azonosító számú szekvencia (WO 02/24719-A1), humán proinzulin-analóg (WO 02/04481-A2), tumorasszociált antigénhatású TAT136-célprotein (WO 02/16429-A2), tumorasszociált antigénhatású célpoli-peptid (TAT-136; WO 02/16581-A2), humán CD30-protein (WO 02/11767-A2), humán 1R2-interleukin (IL-1R2)-protein (WO 02/11767-A2), humán G-proteinnel kapcsolt receptor-7 (GPCR-7)-protein (WO 02/06342-A2), humán G-proteinnel kapcsolt receptor-6a (GPCR6a; WO 02/08289-A2), humán G-proteinnel kapcsolt receptor-6b (GPCR6b; WO 02/08289-A2), humán II. típusú interleukin-1-receptor (WO 01/87328-A2), humán A259-poli-peptid (WO 01/81414-A2), humán érfali sejtadhéziós molekula-1 (VCAM1; US6307025-B1), humán érfali sejtadhéziós molekula-1b (VCAM1b; US6307025-B1), humán transzporterek és ioncsatornák (TRICH)-6 (WO 01/77174-A2), és humán proteinmódosítási és fenntartási molekula-8 (PMMM-8; WO 02/02603-A2).

A találmány szerinti heterológ poli-peptidet úgy állítjuk elő, hogy (a) heterológ poli-peptidet kódoló nukleinsavat tartalmazó sejteket tenyésztünk; és (b) a sejtekből kinyerjük a poli-peptidet. A poli-peptidet a sejt citoplazmájából, periplazmájából vagy tenyésztő tápközegéből nyerhetjük ki, előnyösen a periplazmából vagy a tápközegből. A tenyésztést előnyösen fermentorban végezzük. A sejtenyésztést és a poli-peptid termeltetését jól ismert módon, szokványos paraméterek alkalmazásával végezzük (lásd például az alábbiakban leírt eljárásokat).

Ha az előállítani kívánt poli-peptid a sejt citoplazmájában termelődik, a sejtek feltárása előtti vagy utáni inkubálásra nincs szükség, bár növelheti a hasított poli-peptid képződésének hatékonyságát. Ha a kívánt poli-peptid a periplazmába vagy a tenyésztő tápközegbe választódik ki, legalább kb. 1/2 órás inkubálást ajánlatos végezni. A periplazmába kiválasztódott poli-peptidek kinyerésének előnyös módszere szerint a sejteket

– például nagyobb mennyiség esetén homogenizátorban, „French” présben vagy mikrofluidizálóberendezésben, míg kisebb mennyiség esetén ultrahangos kezeléssel – feltárjuk, majd lizátumot készítünk, amelyből ép polipeptid tisztítható. A lizátumot a tisztítási lépés előtt inkubálásnak vetjük alá. Az inkubálást alkalmas hőmérsékleten, előnyösen szobahőmérsékleten vagy még alacsonyabb hőmérsékleten, legalább kb. egy óra hosszat, előnyösebben kb. 2–50 órán át végezzük. Az eljárás szempontjából előnyös polipeptideket és sejttípusokat fentebb ismertettük.

A polipeptid N-terminális aminosava lehasításának megakadályozására úgy járunk el, hogy a polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmazó sejtet a nukleinsav expresszióját elősegítő feltételek mellett tenyésztjük. Az ilyen tenyésztési feltételek szakember számára jól ismertek. Előnyösen a polipeptidet a folyamat végén kinyerjük a sejtéből.

Fordított esetben a hasított polipeptidet kell megtisztítani a nem hasított (szennyezésként jelen lévő) polipeptidtől. Ennek megfelelően a polipeptidet b2324-aminopeptidáz-proteinnel érintkeztetjük, előnyösen oly módon, hogy a polipeptidet a b2324-aminopeptidáz-proteinnel együtt inkubáljuk. A hasított polipeptid előállításának egy másik eljárása során – az alkalmazott sejtekre nézve endogén vagy heterológ – yfcK-gént hordozó baktériumsejteket tenyésztünk, mely baktériumsejtek megfelelő, nem hasított (N-terminálisán hozzáadott aminosavat tartalmazó) polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaznak, és a tenyésztést olyan feltételek mellett végezzük, amelyek elősegítik az yfcK-gén expresszióját vagy túlzott mértékű expresszióját, valamint a nem hasított polipeptidet kódoló nukleinsav expresszióját, és ha a nem hasított polipeptid és a b2324-aminopeptidáz-protein az expresszáltatás után nem érintkezik egymással, a nem hasított polipeptidet érintkeztetjük a b2324-aminopeptidáz-proteinnel, előállítva ezáltal a hasított polipeptidet.

Előnyösen olyan polipeptidet hasítunk, amely a sejtek szempontjából heterológ, még előnyösebben, amely a fentebb felsorolt kategóriák valamelyikébe tartozik. Az eljárásban előnyösen a fentebb megadott sejttípusok valamelyikét alkalmazzuk. Az yfcK-gének vektor alkalmazásával juttathatók be a gazdasejtbe, illetve a sejt számára endogének lehetnek. A gazdasejtekben az yfcK-gén – a polipeptidet kódoló nukleinsavhoz viszonyítva – előnyösen túlzott mértékben expresszálódik, ami kedvez az enzimatis hasítási reakciónak.

A nem hasított polipeptidet a b2324-aminopeptidáz-proteinnel történő érintkezés előtt kinyerjük a sejtekből, melynek során a sejteket (fentebb említett technikák alkalmazásával) feltárjuk, majd emésztjük. Az emésztés után a nem hasított polipeptidet előnyösen b2324-aminopeptidáz-proteinnel inkubáljuk, lehasítva ezáltal az N-terminális aminosavat, és a hasított polipeptidet az inkubált lizátumból tisztítjuk. A lizátumot kb. 20–40 °C-on legalább kb. egy órán át, még előnyösebben kb. 30–40 °C-on kb. 2–50 órán át inkubáljuk.

1. Nem hasított polipeptid termeltetése és kinyerése

A) Nukleinsav inszertálása replikációra képes vektorba

A polipeptidet kódoló nukleinsavként, alkalmas módon, tetszőleges forrásból származó cDNS vagy genomi DNS alkalmazható, feltéve, hogy kódolja a kívánt polipeptide(ke)t.

A heterológ nukleinsavat (például cDNS-t vagy genomi DNS-t) baktériumsejtekben történő expresszáltatása céljából (megfelelő promotor szabályozása alatt) replikációra képes vektorba inszertáljuk. Erre a célra számos vektor alkalmas; a megfelelő vektor kiválasztása elsősorban az inszertálni kívánt nukleinsav méretétől és a vektorral transzformálni kívánt gazdasejttől függ. A vektorok, a konkrét gazdasejttől függően (amellyel kompatibilisak), különböző komponenseket tartalmaznak. A vektorok, többek között, a következő komponenseket tartalmazhatják: szignálszekvencia, replikációs kezdőhely, egy vagy több markergén, promotor és transzkripció terminációs szekvencia.

A replikont és – a gazdasejttel kompatibilis fajból származó – szabályozószekvenciákat tartalmazó plazmidvektorokat általában *E. coli* gazdasejtekben alkalmazzuk. A vektor rendszerint tartalmaz egy replikációs helyet, valamint markerszekvenciákat, amelyek lehetővé teszik a transzformált sejtek fenotípuson alapuló szelektálását. Például *E. coli*-sejtek transzformálására általában pBR322-plazmidot alkalmaznak, amely egy *E. coli*-törzsből származik [lásd például Bolivar és munkatársai: Gene 2, 95 (1977)]. A pBR322-plazmid ampicillin- és tetraciklinrezisztencia-gént tartalmaz, ezáltal egyszerű módját biztosítja a transzformált sejtek azonosításának. A pBR322-plazmid (más bakteriális plazmidokhoz vagy fágokhoz hasonlóan) általában olyan promotereket tartalmaz, amelyek *E. coli* gazdasejtekben alkalmasak a szelektálható markergének expressziójának szabályozására.

(i) Szignálszekvencia-komponens

A kívánt polipeptidet kódoló DNS nemcsak közvetlenül expresszáltatható, de más polipeptiddel (előnyösen szignálszekvenciával vagy egyéb, az érett polipeptid N-terminálisán specifikus hasítási helyet tartalmazó polipeptiddel) képzett fúziós polipeptid létrehozására is felhasználható. A szignálszekvencia általában a vektor komponense, de lehet a polipeptidet kódoló – vektorba inszertált – DNS része is. Heterológ szignálszekvenciaként előnyösen olyan szekvenciát alkalmazunk, amelyet a gazdasejt képes felismerni és feldolgozni (azaz szignálpeptidázzal lehasítani).

Bakteriális gazdasejtek esetében, amelyek nem ismerik fel a természetes vagy eukarióta polipeptid szignálszekvenciáját, azt megfelelő prokarióta szignálszekvenciával helyettesítjük. Az alkalmas prokarióta szignálszekvenciák közé tartozik az alkalikus foszfatáz, penicillináz, lpp vagy a hőstabil enterotoxin-II vezetőszekvenciája.

(ii) Replikációs kezdőhely komponens

Az expressziós vektorok tartalmaznak olyan nukleinsavszekvenciát, amely lehetővé teszi a vektor egy

vagy több kiválasztott gazdasejtben történő replikációját. Az ilyen szekvenciák különféle baktériumok esetében jól ismertek. A pBR322-plazmid replikációs kezdőhelye a legtöbb Gram-negatív baktériumban (így *E. coli*-ban is) alkalmazható.

(iii) Szelekciós gén komponens

Az expressziós vektorok általában tartalmaznak szelekciós gént (más néven szelektálható markert) is. A szelekciós gén olyan proteint kódol, amely nélkülözhetetlen a szelektív tápközegen tenyésztett, transzformált gazdasejtek életben maradásához vagy szaporodásához. A szelekciós gént tartalmazó vektorral transzformált gazdasejtek az ilyen tápközegben nem maradnak életképesek. Az ilyen szelektálható marker nem azonos a tálmány értelmében alkalmazott genetikai markerekkel. A jellemző szelekciós gének olyan proteinek kódolnak, amelyek (a) antibiotikumokkal vagy egyéb toxinokkal (például ampicillin, neomicin, methotrexát vagy tetraciklin) szembeni rezisztenciát biztosítanak; (b) auxotróf deficienciákat egészítenek ki [kivéve azokat, amelyeket a genetikai marker(ek) jelenléte okoz]; vagy (c) komplex tápközegben nem található, kulcsfontosságú tápanyagokat biztosítanak (például *Bacillus*-ok esetében a D-alanin racemáz).

A szelekciós rendszerek egyik példája a gazdasejt szaporodását gátló hatóanyag alkalmazásán alapul. A heterológ génnel sikeresen transzformált sejtek olyan proteint termelnek, amely drogrezisztenciát biztosít, s ezáltal ezek a sejtek a szelekciót követően életben maradnak. Az ilyen domináns szelekció példáiként a neomicin [Southern és munkatársai: *J. Molec. Appl. Genet.* 1, 327 (1982)], a mikofenolsav [Mulligan és munkatársai: *Science* 209, 1422 (1980)] és a higromicin alkalmazása [Sugden és munkatársai: *Mol. Cell. Biol.* 5, 410 (1985)] említhető. E három esetben eukariótaszabályozás alatt bakteriális géneket alkalmaznak, melyek G418-cal vagy neomicinnel (geneticin), xgpt-vel (mikofenolsav), illetve higromicinnel szembeni rezisztenciát közvetítenek.

(iv) Promoterkomponens

A kívánt polipeptid termeltetésére alkalmas expressziós vektor megfelelő promotert is tartalmaz, amelyet a gazdaorganizmus felismer, és amely a kérdéses polipeptidet kódoló nukleinsavhoz működőképesen kapcsolódik. A prokarióta gazdasejtekben alkalmazható promoterek közé tartoznak a β -laktamáz és laktóz promoterrendszerek [Chang és munkatársai: *Nature* 275, 615 (1978); Goeddel és munkatársai: *Nature* 281, 544 (1979)]; az arabinóz promoterrendszer [Guzman és munkatársai: *J. Bacteriol.* 174, 7716 (1992)]; alkalikus foszfatáz, triptofán (trp) promoterrendszer [Goeddel: *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980) és EP 36 776 számú európai szabadalmi leírás], valamint hibrid promoterek, mint például a tac-promoter [deBoer és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 21 (1983)], azonban egyéb ismert bakteriális promoterek is alkalmazhatók. Az ilyen promoterek nukleotidszekvenciája jól ismert, így szakember számára nem okoz gondot ezek kívánt polipeptidet kódoló DNS-hez történő ligálása [Siebenlist és munkatársai:

Cell 20, 269 (1980)], melynek során – a szükséges restriktációs felismerési helyek biztosítása érdekében – megfelelő kapcsolószekvenciák vagy adapterszekvenciák alkalmazhatók.

- 5 A bakteriális rendszerekben alkalmazható promoterek rendszerint – az adott polipeptidet kódoló DNS-hez működőképesen kapcsolva – Shine–Dalgarno (S. D.)-szekvenciát is tartalmaznak. A promoter restriktációs enzim emésztéssel hasítható ki a bakteriális forrás DNS-ből, majd a kívánt DNS-t tartalmazó vektorba inszertálható.

(v) Vektorok előállítása és analízise

- A fentebb felsorolt komponensekből egyet vagy többet tartalmazó vektorok előállítása során standard ligálási technikákat alkalmazunk. Az izolált plazmidokat vagy DNS-fragmenseket hasítjuk, megfelelő méretűre alakítjuk, majd kívánt formában ismét egymáshoz ligálva a tervezett plazmidokat hozzuk létre.

- Az így előállított plazmidok megfelelő szekvenciájának ellenőrzése céljából a ligálási eleggyel *E. coli* K-12 294-es törzset (ATCC 31446) vagy más törzset transzformálunk, és a sikeres transzformánsokat, alkalmas módon, ampicillin- vagy tetraciklinrezisztencia alapján szelektáljuk. A transzformánsokból plazmidokat állítunk elő, azokat restriktációs endonukleázos emésztéssel analizáljuk, és/vagy Sanger és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)] vagy Messing és munkatársai [Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981)] vagy Maxam és munkatársai [Methods in Enzymology 65, 499 (1980)] eljárásával szekvenáljuk.

B) Gazdasejtek szelektálása és transzformálása

- Ahogy fentebb említettük, az yfcK-gén vonatkozásában hiányos sejt-ként számos Gram-negatív baktériumsejt alkalmazható (példákat lásd fentebb). Kiindulási gazdatörzsként előnyösen alkalmazható az *E. coli* W3110-törzs, mivel széles körben alkalmazzák rekombináns DNS-termékek fermentációs gazdatörzseként. A tálmány előnyös megvalósítási módjai értelmében a gazdasejt minimális mennyiségben választhat ki proteolitikus enzimeket. Például a W3110-törzs úgy módosítható, hogy proteinek kódoló génjeiben mutáció következzen be. A gazdatörzsekként alkalmazható *E. coli*-törzsek példáit (genotípusuk feltüntetésével) az alábbi táblázatban soroljuk fel.

Törzs	Genotípus
W3110	K-12 F ⁻ lambda ⁻ IN (<i>rrnD-rrnE</i>)1
1A2	W3110 Δ <i>fhuA</i> vagy W3110 <i>tonA</i> Δ
7C1	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15
9E4	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i>
16C9	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15 <i>deoC2</i>
23E3	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15 <i>deoC2</i> <i>degP::kanR</i>
27A7	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169

Táblázat (folytatás)

Törzs	Genotípus
27C6	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3 phoA\Delta 15 \Delta(argF-lac)169 \Delta ompT$
27C7	W3110 $\Delta fhuA ptr3 phoA-$ $\Delta E15 \Delta(argF-lac)169 \Delta ompT degP41$ ($\Delta pstl-kan^R$)
33B6	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta(argF-lac)169 phoA\Delta 15 deoC2$ $degP::kanR ilvG2096$
33D3	W3110 $\Delta fhuA ptr3 lacIq lacL8 \Delta ompT$ $degP41 (\Delta pstl-kan^R)$
36F8	W3110 $\Delta fhuA$ $phoA\Delta 15 \Delta(argF-lac)169 ptr3 degP41$ ($\Delta pstl-kan^R$) $ilvG2096^R$
37D6	W3110 $tonA\Delta$ $ptr3 phoA\Delta 15 \Delta(argF-lac)169 ompT\Delta$ $degP41 kan^r rbs7\Delta ilvG$
40B4	Nem kanamicinrezisztens $degP$ deléció mutációt hordozó 37D6-törzs
40G3	W3110 $tonA\Delta phoA-$ $\Delta E15 \Delta(argF-lac)169 deoC \Delta ompT$ $degP41 (\Delta PstI-kan^r) ilvG2096^R$ $phn(EcoB)$
43D3	W3110 $\Delta fhuA ptr3 phoA-$ $\Delta E15 \Delta(argF-lac)169 \Delta ompT degP41$ ($\Delta Pst1-kan^R$) $ilvG2096^R$
43E7	W3110 $\Delta fhuA \Delta(argF-lac)169 \Delta ompT$ $ptr3 phoA\Delta E15 degP41 (\Delta Pst1-kan^S)$ $ilvG2096^R$
44D6	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3 \Delta(argF-lac)169 degP41$ ($\Delta pst1-kan^S$) $\Delta ompT ilvG2096^R$
45F8	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3 \Delta(argF-lac)169 degP41 (\Delta pst1-kan^S)$ $\Delta ompT phoS^* (T10Y) ilvG2096^R$
45F9	W3110 $\Delta fhuA$ $ptr3 \Delta(argF-lac)169 degP41 (\Delta pst1-kan^S)$ $\Delta ompT ilvG2096^R phoS^* (T10Y)$ $\Delta cyo::kan^R$

Szintén alkalmasak a 36F8-törzs létrehozásának köztes termékei, vagyis a 27B4 (lásd az 5 304 472 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) és a 35E7 (amely egy spontán hőmérséklet-rezisztens kolóniaizolátum, mely a 27B4-törzsnél jobb növekedésű). Egy további alkalmas törzs a mutáns periplazmikus proteáz(oka)t tartalmazó *E. coli*-törzs, melyet a 4 946 783 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tártak fel.

A találmány szerinti mutáns sejt az *yfcK*-gén szülői sejtbe történő kromoszomális integrálásával vagy más technikák alkalmazásával hozhatók létre (ideértve a példákban leírt módszereket).

A polipeptidet kódoló nukleinsavat a gazdasejtekbe inszertáljuk. A nukleinsavat bármely alkalmas módszerrel (például kívánt polipeptidet kódoló expressziós vektorral történő transzformációval) bejuttathatjuk a megfelelő baktériumsejtbe. A transzformáció során a DNS-t egy or-

ganizmusba juttatjuk be oly módon, hogy a DNS – extra-kromoszomális elemként vagy a gazdasejt kromoszómájába integrálódva – replikációra képes legyen. A transzformációt – az alkalmazott gazdasejttől függően – standardtechnikák alkalmazásával hajtjuk végre. Prokarióta sejtek és más, jelentős sejtfalgátakat tartalmazó sejtek esetében általában a kalcium-kloridos kezelés alkalmazható [lásd Sambrook és munkatársai „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” című művének (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 1.82 szakaszát]. Egy másik technika a polietilén-glikol/DMSO alkalmazásával végzett transzformáció [lásd Chung és Miller: Nucleic Acids Res. 16, 3580 (1988)]. Egy további eljárás az elektroporáció néven ismert technika.

A polipeptidet kódoló gén *E. coli* gazdasejtgenomban történő inszertálásával végrehajtott transzformáció egyik példája szerint a transzformálásra alkalmazandó vektorba *E. coli* genomi DNS-ében található szekvenenciával komplementer DNS-szekvenciát foglalunk, és az *E. coli*-sejtek e vektorral történő transzfektálása a genommal homológ rekombinációt és a polipeptidet kódoló gén inszercióját eredményezi. A nukleinsavat előnyösen oly módon inszertáljuk az *E. coli* genomjába, hogy a gazdasejtek a fentebb leírt expressziós vektorokkal transzformáljuk, majd hagyományos – a különböző promoterek indukálásához megfelelően módosított – tápközegben tenyésztjük.

C) A gazdasejtek tenyésztése

A kívánt polipeptid termeltetésére kiválasztott prokarióta sejteket megfelelő tápközegben, lényegében Sambrook és munkatársai (lásd fentebb) leírása szerint tenyésztjük.

Egy expresszált vagy túlzott mértékben expresszált géntermék szekréciójának előidézése céljából a gazdasejtet a géntermék szekréciójához alkalmas feltételek mellett tenyésztjük. Az ilyen tenyésztési feltételek közé tartozik például a sejt szekrécióját elősegítő hőmérséklet, tápanyagellátás és sejtsűrűség. Idesorolhatók továbbá azok a feltételek, amelyek mellett a sejt képes az olyan alapvető celluláris funkciók végrehajtására, mint a transzkripció, transláció és a proteinek egyik celluláris kompartmentből másikba történő szállítása.

Alkalikus foszfátáz promotor alkalmazása esetén a találmány szerinti polipeptid termeltetésére kiválasztott *E. coli*-sejteket megfelelő tápközegben tenyésztjük, amely biztosítja az alkalikus foszfátáz promotor részleges vagy teljes indukcióját (lásd például Sambrook és munkatársai fentebb idézett művét). A tenyésztést soha nem szervesen foszfát hiányában vagy foszfát-hiányos feltételek mellett végezzük. A tápközeg kezdetben olyan mennyiségben tartalmaz szervesen foszfátot, amely a baktérium szaporodásához elégséges, a proteinszintézis indukálásához szükséges koncentrációnál azonban nagyobb. Ahogy a sejtek szaporodnak és felhasználják a foszfátot, a tápközegben csökkenni kezd a foszfátkoncentráció, ami a polipeptid szintézisének indukcióját eredményezi.

A szén-, nitrogén- és szervesen foszfátforrás mellett az egyéb szükséges tápközeg-összetevők megfe-

lelő koncentrációkban – önmagukban vagy egyéb összetevőkkel vagy tápközzel alkotott elegyként (például komplex nitrogénforrásként) – a tápközeghez adhatók. A tápközeg pH-ja, elsősorban az alkalmazott gazdaszervezettől függően, 5 és 9 közötti érték lehet.

Indukálható promotor alkalmazása esetén a sejteket, az indukció bekövetkezése érdekében, rendszerint egy adott optikaidenzitás-érték (például nagy sejtsűrűségű fermentáció esetén kb. 200-as A_{550} -érték) eléréséig tenyésztjük, amely pontnál az indukciót beindítjuk (például indukálószer hozzáadásával, a tápközeg egy komponense koncentrációjának lecsökkentésével stb.), miáltal a kérdéses polipeptidet kódoló gén expresszióját indukáljuk.

D) Az expresszió detektálása

Egy mintában a génexpressziót közvetlenül, például hagyományos Southern-blot-analízissel, az mRNS transzkripciójának mennyiségi meghatározását lehetővé tevő Northern-blot-analízissel [lásd Thomas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201 (1980)], „dot-blot” analízissel (DNS-analízis) vagy – a polipeptid szekvenációján alapuló, megfelelő módon jelölt próba alkalmazásával végzett – *in situ* hibridizációval mérhetjük. A próbák jelölésére különböző jelölők alkalmazhatók, leggyakrabban radioaktív izotópok, elsősorban ^{32}P -izotóp. Mindazonáltal egyéb technikák is alkalmasak lehetnek; például a polinukleotidba biotinnal módosított nukleotidok építhetők be, ahol is a biotin az avidin vagy antitestek (melyek különféle jelölőkkel, például radionuklidokkal, fluoreszcens jelölőkkel, enzimekkel és hasonlókkal jelölhetők) kötőhelyeként szolgál. Más módon, a protein kimutatására megfelelő vizsgálati eljárások vagy gélek alkalmazhatók.

Az expresszált vagy túlzott mértékben expresszált géntermék szekréciójának megállapítására alkalmas eljárások szakember számára jól ismertek. Miután a tenyésztő tápközeget – például centrifugálással vagy szűréssel – elválasztottuk a gazdaszektől, a génterméket (annak ismert, jellemző tulajdonságainak kihasználásával) a sejtmentes tápközegben vagy a sejtenyészetben detektáljuk. Az ilyen tulajdonságok közé tartoznak az immunológiai, enzimatis és fizikai sajátosságok.

Például ha egy túlzott mértékben expresszáldó géntermék egyedi enzimaktivitás kifejtésére képes, a gazdaszekt tenyésztő tápközegében vagy a kivont sejttöredékben ilyen aktivitás meghatározására alkalmas tesztet végezhetünk. Ezen túlmenően, ha egy adott géntermék ellen reaktív antitestek állnak rendelkezésre, azok felhasználhatók a géntermék bármely ismert immunológiai tesztel történő kimutatására [lásd például Harlowe és munkatársai: „Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988)].

Ha a géntermék szekretálódik, olyan tesztek alkalmazásával is kimutatható, amelyek a polipeptideket jellemző fizikai tulajdonságaik (például molekulatömegük) alapján különböztetik meg. A géntermék fizikai sajátosságainak detektálása céljából a gazdaszekt által újonnan

termelt valamennyi polipeptidet megjelöljük (például radioaktív izotóppal). A gazdaszektben termelődött polipeptidek jelölésére alkalmas radioaktív izotópok jellemző példái közé tartozik a trícium (^3H), a ^{14}C , ^{35}S stb. Például a gazdaszektet ^{35}S -metionint vagy ^{35}S -ciszteint tartalmazó tápközegben tenyésztjük, és a ^{35}S -izotóp jelentős mennyiségben elsősorban az újonnan szintetizált polipeptidekbe (köztük a túlzott mértékben termelődő heterológ polipeptidbe) épül be. Ezt követően a ^{35}S -izotópot tartalmazó tenyésztő tápközeget eltávolítjuk, a sejteket leöblítjük, majd friss, nem radioaktív tenyésztő tápközegbe helyezük át. A sejteket a ^{35}S -izotóppal jelölt heterológ polipeptid szekréciójához elegendő ideig és megfelelő feltételek mellett a friss tápközegben tartjuk, majd a tenyésztő tápközeget összegyűjtjük és elkülönítjük a gazdaszektől. A tenyésztő tápközegben vagy a sejttöredékben lévő szekretált, jelölt polipeptid molekulatömegét ismert módszerekkel (például poliakrilamid-gélelektroforézissel) határozhatjuk meg. Az ilyen módszerek és/vagy a szekretált géntermék kimutatására alkalmas egyéb eljárások leírását illetően lásd „Gene Expression Technology”, Methods in Enzymology 185. szám, szerk.: Goeddel, D. V., Academic Press (1990); valamint Sambrook és munkatársai fentebb idézett művét.

E) Polipeptidek kinyerése/tisztítása

A polipeptidet, termelődése után, bármely alkalmas módszerrel kinyerhetjük a sejtől. A konkrét módszert például attól függően választjuk ki, hogy a polipeptidet a sejt mely részéből kell kinyerni. A polipeptid kinyerése történhet a sejt citoplazmájából, periplazmájából vagy tenyésztő tápközegéből. A polipeptidet előnyösen a periplazmából vagy a tenyésztő tápközegből – szekretált polipeptid formájában – nyerjük ki. A termelődött polipeptidet rekombináns sejtproteinekből vagy polipeptidekből tisztítjuk, miáltal olyan készítményeket kapunk, amelyek a kérdéses polipeptid vonatkozásában lényegében homológok. Első lépésként a tenyésztő tápközeget vagy lizátumot a szemcsés sejtörmelék eltávolítása céljából lecentrifugáljuk, majd – ha szükséges – a membránfrakciót és az oldható proteinek frakcióját elválasztjuk. A polipeptidet az oldható proteinek frakciójából és a lizátum membránfrakciójából tisztíthatjuk, attól függően, hogy a szóban forgó polipeptid membránkötött, oldható vagy aggregált alakban van jelen. Ezt követően a polipeptidet szolubilizáljuk, és – ha szükséges – visszaalakítjuk harmadlagos szerkezetét („refolding”), majd megtisztítjuk a szennyezésként jelen lévő oldható proteinektől és polipeptidektől. A tisztítási folyamatból kihagyhatók a hasított polipeptid szennyezések elegyből történő eltávolításának jellemző lépései, mivel a sejtekben aminoszékretáz nincs jelen. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint aggregált polipeptidet izolálunk, majd egyidejűleg szolubilizálási és „refolding” lépést hajtunk végre (lásd az 5 288 931 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást).

Különösen előnyösen a polipeptid kinyerését úgy hajtjuk végre, hogy a sejtet (a fentebb említett technikák alkalmazásával) feltárjuk, majd az ép, nem hasított

polipeptidet a kapott lizátumból tisztítjuk, melyet előzetesen inkubálásnak vetünk alá. Az inkubálást előnyösen kb. 20–25 °C-on legalább kb. egy óra hosszat, előnyösebben szobahőmérsékleten kb. 2–50 óra hosszat, még előnyösebben szobahőmérsékleten kb. 2–50 óra hosszat, legelőnyösebben szobahőmérsékleten kb. 20–30 órán át folytatjuk.

A polipeptidek tisztítására alkalmas tisztítási eljárások jellemző példái a következők: immunaffinitási vagy ioncserélő oszlopon végzett frakcionálás; etanolos precipitáció; reverz fázisú, nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC); szilikagél- vagy ioncserélő kromatográfia (például DEAE-gyanta alkalmazásával); kromatofokuszálás; SDS-PAGE; ammónium-szulfátos precipitáció; és gélfiltráció, például Sephadex G-75TM oszlopok alkalmazásával.

II. A hasított polipeptid előállítás és kinyerése

Ezen alternatív eljárás során a polipeptidet – N-terminális aminosavának lehasítása céljából – közvetlenül b2324-aminopeptidáz-polipeptiddel érintkeztetjük, amit többféle módon hajthatunk végre. Például a hasítani kívánt polipeptidet kb. 20–40 °C-on, előnyösen 30–40 °C-on, kb. 50 óráig terjedő időtartamban (előnyösen 1–45 óra hosszat) inkubáljuk a b2324-aminopeptidázzal. E megoldás egy előnyös megvalósítási módja értelmében eljárást tárunk fel hasított polipeptid előállítására, melynek során yfck-gént hordozó baktériumsejteket tenyésztünk, mely baktériumsejtek megfelelő, nem hasított (N-terminálisán hozzáadott aminosavat tartalmazó) polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaznak, és a tenyésztést olyan feltételek mellett végezzük, amelyek elősegítik az yfck-gén expresszióját vagy túlzott mértékű expresszióját, valamint a nem hasított polipeptidet kódoló nukleinsav expresszióját. Ha a nem hasított polipeptid és a b2324-aminopeptidáz-protein az expresszáltatás után nem érintkezik egymással, a nem hasított polipeptidet érintkeztetjük a b2324-aminopeptidáz-proteinnel, előállítva ezáltal a hasított polipeptidet. A polipeptid és az aminopeptidáz érintkeztetését előnyösen a leírásban ismertetett feltételek mellett végezzük, és a tenyésztést fermentorban hajtjuk végre.

Célszerűen a polipeptid az alkalmazott sejtekre nézve heterológ, előnyösen eukarióta, még előnyösebben emlőseredetű (elsősorban humán) polipeptid. Az eljárás során gazdasejtként előnyösen *Salmonella* nemzetségbe vagy *Enterobacteriaceae* családba tartozó sejteket, még előnyösebben *E. coli*-sejteket, legelőnyösebben *E. coli* W3110-törzset alkalmazunk. Előnyös továbbá, ha a sejt legalább egy proteáz kódoló génjére (például degP és/vagy fhuA) nézve hiányos.

A tenyésztést olyan feltételek mellett is végezhetjük, amelyek az yfck-gén túlzott mértékű expresszióját teszik lehetővé. Az yfck-gén a baktériumsejtekre nézve natív vagy – ilyen gént hordozó vektorral végzett transzformáció eredményeként – a sejtbe bejuttatott gén lehet.

Úgy is eljárhatunk, hogy a nem hasított polipeptidet a b2324-aminopeptidáz-proteinnel történő érintkezés

előtt kinyerjük a sejtekből, és a nem hasított polipeptidet a sejt periplazmájából vagy tenyésztő tápközegéből vonjuk ki. Az egyik megvalósítási módban a sejteket (fentebb említett technikák alkalmazásával) feltárva sejtlyázatot hozunk létre, amelyhez hozzáadjuk az aminopeptidázt, majd a hasított polipeptidet a lizátumból tisztítjuk. Ebben az esetben a lizátumot előnyösen a tisztítási lépés előtt inkubáljuk az aminopeptidázzal. További lehetőség az, hogy a lizátumot – a tisztítási lépés előtt – kb. 20–40 °C-on legalább kb. egy órán át, még előnyösebben kb. 30–40 °C-on kb. 2–50 órán át inkubáljuk, még előnyösebben kb. 30–40 °C-on kb. 5–45 óra hosszat, legelőnyösebben kb. 35–38 °C-on kb. 20–30 óra hosszat inkubáljuk.

Amennyiben a hasított polipeptideket rekombináns módszerekkel állítjuk elő, a kiindulási törzsek, tenyésztési feltételek, az expresszió detektálása, a polipeptid kinyerése/tisztítása és az alapvető technikák meg egyeznek a fentebb leírtakkal. Mindazonáltal ha a tenyésztett törzsben az yfck-gén túlzott mértékű expresszáltatása kívánatos – függetlenül attól, hogy e gén a gazdasejtre nézve endogén (a kromoszómában) vagy exogén –, az yfck-gént működőképesen indukálható promoterhez kapcsoljuk, és a promoter indukálását követően bekövetkezhet a gén túlzott mértékű expressziója. A tenyésztést előnyösen olyan feltételek mellett végezzük, melyek lehetővé teszik, hogy az yfck-gén expressziójának indukciója a polipeptid kódoló nukleinsav expressziójának indukálása előtt következzon be. A gének túlzott mértékű expresszáltatására alkalmas technikák leírását illetően lásd Joly és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2773 (1998); 5 789 199 és 5 639 635 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Knappik és munkatársai: Bio/Technology 11(1), 77 (1993); Wulfinig és Pluckthun: Journal of Molecular Biology 242(5), 655 (1994).

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban az alábbi példán keresztül szemléltetjük, amely semmilyen szempontból nem korlátozza a találmány igényelt oltalmi körét. A leírásban említett valamennyi irodalmi és szabadalmi hivatkozás teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintendő.

1. példa

Anyagok és módszerek

A b2324-aminopeptidázt kódoló – *E. coli*-genom-szekvenálási projektben azonosított – yfck-gén [lásd Blattner és munkatársai: Science 277, 1453 (1997); GenBank nyilvántartási szám: AE000321] 5'- és 3'-oldali DNS-szekvenciáit polimeráz-lánreakcióval amplifikáltuk, majd e fuzionált szekvenciákat P1-transzdukcióval egy W3110-törzs kromoszómájába inszertáltuk, és polimeráz-lánreakcióval deléciókra szkríneltük [Metcalfe és munkatársai: Gene és munkatársai: 138, 1 (1994)], létrehozva ezáltal a 61G3-törzset, amelynek genotípusa a következő: W3110 $\Delta fhuA \Delta (arg-F-lac) 169 phoA \Delta E15 deoC2 degP::kanR ilvG2096 \Delta yfck$.

Ezt a törzset több lépésben, P1-fágból származó P1kc-fág alkalmazásával végzett transzdukcióval [J. Miller: „Experiments in Molecular Genetics”, Cold

Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)] és transzpozongenetikai módszerekkel [Klecker és munkatársai: J. Mol. Biol., 116: 125–159 (1977)] hoztuk létre. Kiindulási gazdatörzsként az *E. coli* K–12 W3110-törzset alkalmaztuk, amely egy „F– lambda–” törzs [Bachmann: Bact. Rev. 36, 525–557 (1972); Bachmann: „Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of Escherichia coli K–12”, 1190–1219. old., in: „Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology”, szerk.: F. C. Neidhardt és munkatársai 2. kötet, American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1987)]. A *tonA* (*fhuA*)-mutáció genomba történő bejuttatásának részletes leírását illetően lásd az 5 304 472 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást. Az *ilv*-génbe Tn10-inszerciót P1-transzdukcióval juttattunk be. Az izoleucin/valin auxotrófiát – *ilvG2096^R*-mutációt hordozó törzsen szaporított P1-fág alkalmazásával – prototrófiává transzdukáltuk [Lawther és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 922 (1981)], amely kijavítja a vad típusú *E. coli* K–12-törzset valinra érzékennyé tevő fáziseltolódást. A *degP41kan^r*-mutáció leírását illetően lásd az 5 304 472 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást. Az *ilvG2096^R* lokusz a 33B6-törzs 40 µg/mL (0,3 mM) valinnal szembeni rezisztenciája alapján igazolható. A *phoAΔE15* és *Δ(arg-F-lac)169* deléció mutációt szintén az 5 304 472 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel. A *deoC2*-mutációt illetően lásd Mark és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 155, 145 (1977). A 61G3-törzs teljes származási diagramját az 1. ábrán mutatjuk be.

Ezt a törzset a pHGH4R expressziós plazmiddal transzformáltuk. Ez a plazmid rázó lombikos tenyésztésben, illetve tizliteres fermentorban végzett tenyésztéssel az (N-terminális fenil-alanint tartalmazó) hGH expresszióját és szekrécióját eredményezi. A pHGH4R-plazmid előállításának részletes leírását lásd Chang és munkatársai: Gene 55, 189 (1987). A 61G3-törzs pHGH4R-plazmiddal végzett transzformálása eredményeként a JJGH1-törzset hoztuk létre. A hGH termelődése után a sejtek ultrahangos kezelésével nyers lizá-

tumot hoztunk létre, melyet 37 °C-on 0–24 óra hosszát, szobahőmérsékleten pedig 0–42 óra hosszát inkubáltunk. A magasabb hőmérséklet alkalmazásának célja a dez-phe-hGH és dez-phe-pro-hGH kimutathatóságának javítása volt, a hGH tisztítása szempontjából azonban nem előnyös. Normális esetben a hGH tisztítását – a hasított alakok mennyiségének csökkentése érdekében – hidegben végezzük.

Ugyanezt a kísérletet egy kontroll kiindulási törzs (16C9; genotípusa: W3110 *ΔfhuA Δ(arg-F-lac)169 phoAΔE15 deoC2*) alkalmazásával is megismételtük, melyet szintén pHGH4R-plazmiddal transzformáltunk. Ez a törzs alkalmas erre a célra, mivel a 61G3-törzsben a *degP*- és *ilvG*-mutáció nem befolyásolja az aminoszintáz-aktivitást.

A kontroll- és kísérleti mintákat a szemcsés anyagok eltávolítása céljából lecentrifugáltuk, és az oldható fázisokat folyadékkromatográfia és tömegspektrometria kombinációjának (LC-MS) alkalmazásával, a hGH teljes hosszúságú, dez-phe- és pez-phe-pro-alakja mennyiségének mérésével vizsgáltuk.

Eredmények

A kontrolltörzs (16C9/pHGH4R) szobahőmérsékleten és 37 °C-on végzett inkubálásával kapott eredményeket a 2., illetve 4. ábrán, míg az (aminopeptidáz vonatkozásában hiányos) JJGH1-törzs szobahőmérsékleten és 37 °C-on végzett inkubálásával kapott eredményeket a 3., illetve 5. ábrán mutatjuk be. E négy ábra számszerű adatait az alábbi, 1. táblázatban foglaljuk össze. Látható, hogy a 37 °C-on végzett 15 órás inkubálást követően gyakorlatilag nem mutatható ki fenil-alanin nélküli hGH-szennyeződés, sőt, inkubálás hiányában a szennyeződések mennyisége még kisebb. Jól látható továbbá, hogy a JJGH1-sejtvonalban az N-terminális fenil-alanin nélküli mutáns polipeptid mennyisége – a kontrollsejtvonalhoz viszonyítva – még a szobahőmérsékleten végzett inkubálást követően is csökkent (valamennyi inkubálási időtartam esetében). A teljes polipeptid tisztítása szokványos, jól ismert kromatográfias eljárásokkal egyszerűen elvégezhető.

1. táblázat

T=37 °C							
Minta	Idő	Terület			Terület %		
		dez-phe	Natív	dez-phe-pro	dez-phe	Natív	dez-phe-pro
Kontroll	0	16 159,80	4 486 460,00	19 642,70	0,36	99,21	0,43
JJGH1	0	11 927,90	3 376 380,00	7 637,14	0,35	99,42	0,22
Kontroll	15	14 372,30	1 097 210,00	976 760,00	46,77	52,53	0,69
JJGH1	15	27 163,70	2 674 010,00	16 357,80	1,00	98,40	0,60
Kontroll	24	1 058 950,00	839 418,00	17 580,50	55,27	43,81	0,92
JJGH1	24	29 409,90	2 306 690,00	11 999,30	1,25	98,23	0,51

1. táblázat (folytatás)

T=RT*							
Minta	Idő	Terület			Terület %		
		dez-phe	Natív	dez-phe-pro	dez-phe	Natív	dez-phe-pro
Kontroll	0	16 159,80	4 486 460,00	19 642,70	0,36	99,21	0,43
JJGH1	0	11 927,90	3 376 380,00	7 637,14	0,35	99,42	0,22
Kontroll	15	46 158,20	364 234,00	7 950,57	1,24	98,53	0,21
JJGH1	15	183 740,00	19 431 400,00	39 130,00	0,94	99,06	0,20
Kontroll	24	100 774,00	4 561 070,00	19 501,10	2,15	97,43	0,42
JJGH1	24	160 737,00	19 711 600,00	98 221,60	0,80	98,70	0,49
Kontroll	42	122 177,00	3 933 770,00	19 246,40	3,00	96,53	0,47
JJGH1	42	213 143,00	18 242 500,00	91 090,90	1,15	98,36	0,49

* Szobahőmérséklet

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a $\Delta yfcK$ -törzs felhasználható a polipeptidek N-terminális hasításának megakadályozására.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Gram-negatív baktériumsejt, amely egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányos, mely gén szekvenciája legalább 80%-ban azonos egy natív szekvenciájú b2324-aminopeptidázt kódoló DNS-molekulával, amely aminopeptidáz a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavait tartalmazza, és aminopeptidázt kódol.

2. Gram-negatív baktériumsejt, amely egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányos, mely gén a 2. azonosító számú szekvencia 1–688. aminosavait tartalmazó aminosavszekvenciával összehasonlítva legalább 80% pozitív aminosavat tartalmazó polipeptidet kódoló DNS-t foglal magában, ahol a polipeptid aminopeptidáz.

3. Gram-negatív baktériumsejt, amely egy kromoszomális gén vonatkozásában hiányos, mely gén szekvenciája legalább 80%-ban azonos a natív yfcK-gén szekvenciájával, amely az 1. azonosító számú szekvencia 1–2067. nukleotidjaiból áll, és aminopeptidázt kódol.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti sejt, amely *Salmonella* nemzetségbe vagy *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumsejt.

5. A 4. igénypont szerinti sejt, amely *E. coli*-sejt.

6. Az 5. igénypont szerinti sejt, amely legalább egy, proteázt kódoló gén vonatkozásában hiányos.

7. Az 5. igénypont szerinti sejt, amely a natív szekvenciájú yfcK-gén vonatkozásában hiányos.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti sejt, amely számára heterológ polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.

25 9. A 8. igénypont szerinti sejt, amely emlőseredetű polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti sejt, amely humán polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti sejt, amely humán növekedési hormont kódoló nukleinsavat tartalmaz.

12. Eljárás heterológ polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) 8–11. igénypontok bármelyike szerinti sejtet tenyésztünk; és

(b) a sejtől kinyerjük a polipeptidet.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tenyésztést fermentorban végezzük, és a polipeptidet a sejt periplazmájából vagy tenyésztő tápközegéből nyerjük ki.

40 14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptid kinyerése céljából a sejtek feltárásával sejtízátumot hozunk létre, és a teljes polipeptidet a sejtízátumból nyerjük ki.

45 15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejtízátumot a tisztítási lépés előtt inkubáljuk.

16. Eljárás egy polipeptid N-terminális aminosava lehasításának megakadályozására, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmazó, 8–11. igénypontok szerinti sejtet olyan feltételek mellett tenyésztjük, melyek lehetővé teszik a nukleinsav expresszióját.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet kinyerjük a sejtől.

1A1 W3110

⇓

1A2 W3110 $\Delta fhuA$

⇓

7C1 W3110 $\Delta fhuA \Delta(arg-F-lac)169 phoA\Delta E15$

⇓

16C9 W3110 $\Delta fhuA \Delta(arg-F-lac)169 phoA\Delta E15 deoC2$

⇓

23E3 W3110 $\Delta fhuA \Delta(arg-F-lac)169 phoA\Delta E15 deoC2 degP::kanR$

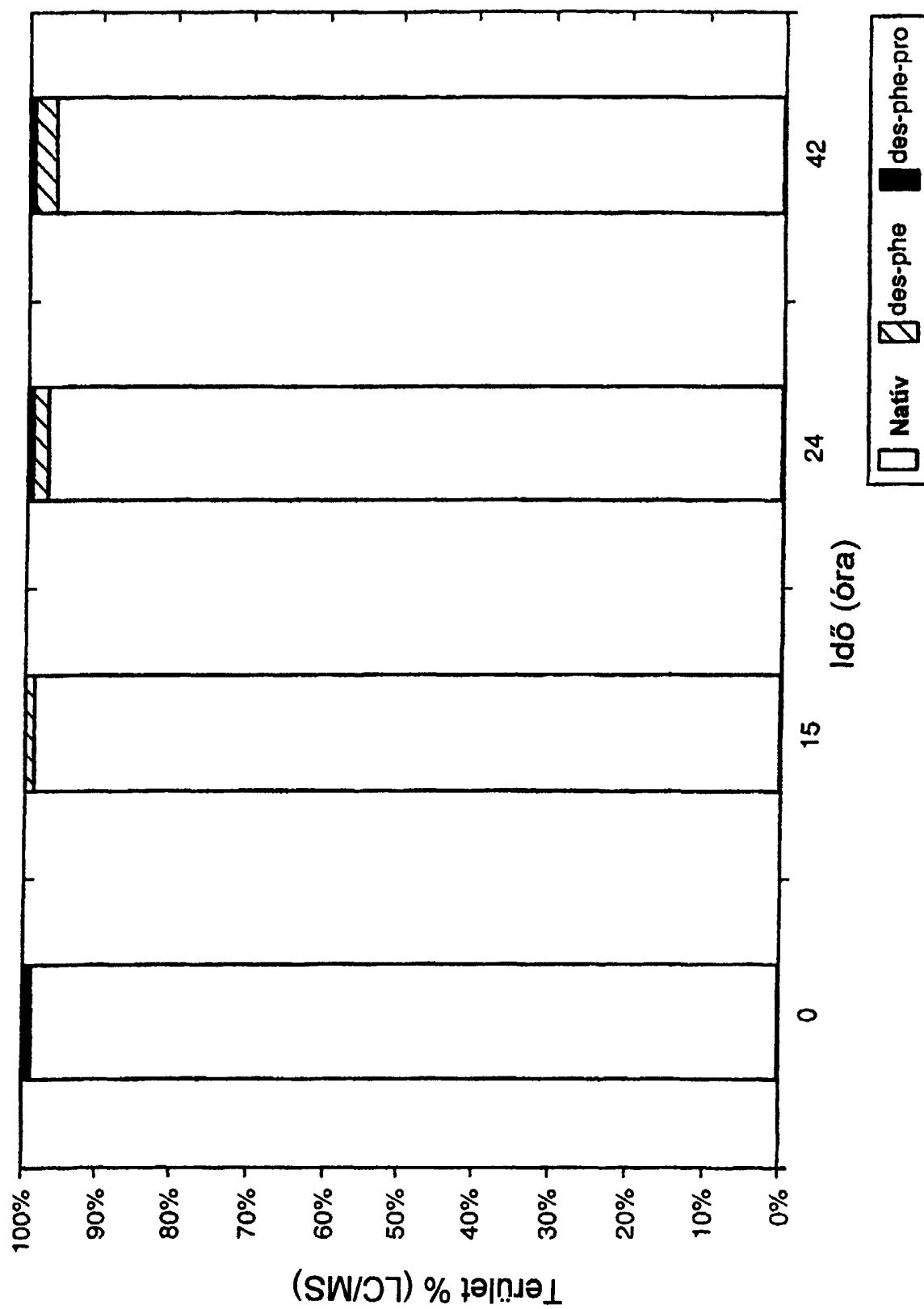
⇓

33B6 W3110 $\Delta fhuA \Delta(arg-F-lac)169 phoA\Delta E15 deoC2 degP::kanR ilvG2096$

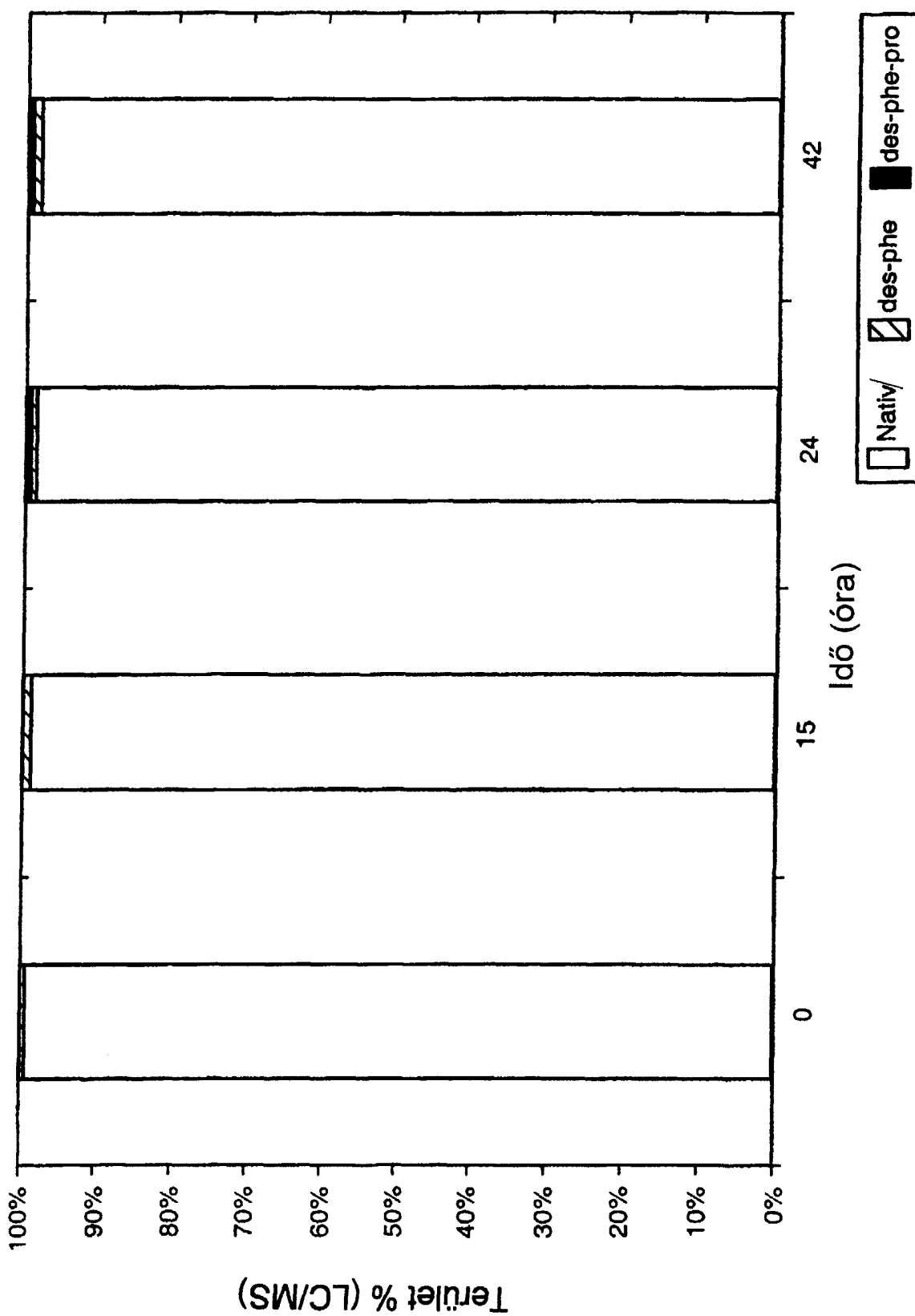
⇓

61G3 W3110 $\Delta fhuA \Delta(arg-F-lac)169 phoA\Delta E15 deoC2 degP::kanR ilvG2096$
 $\Delta yfcK$

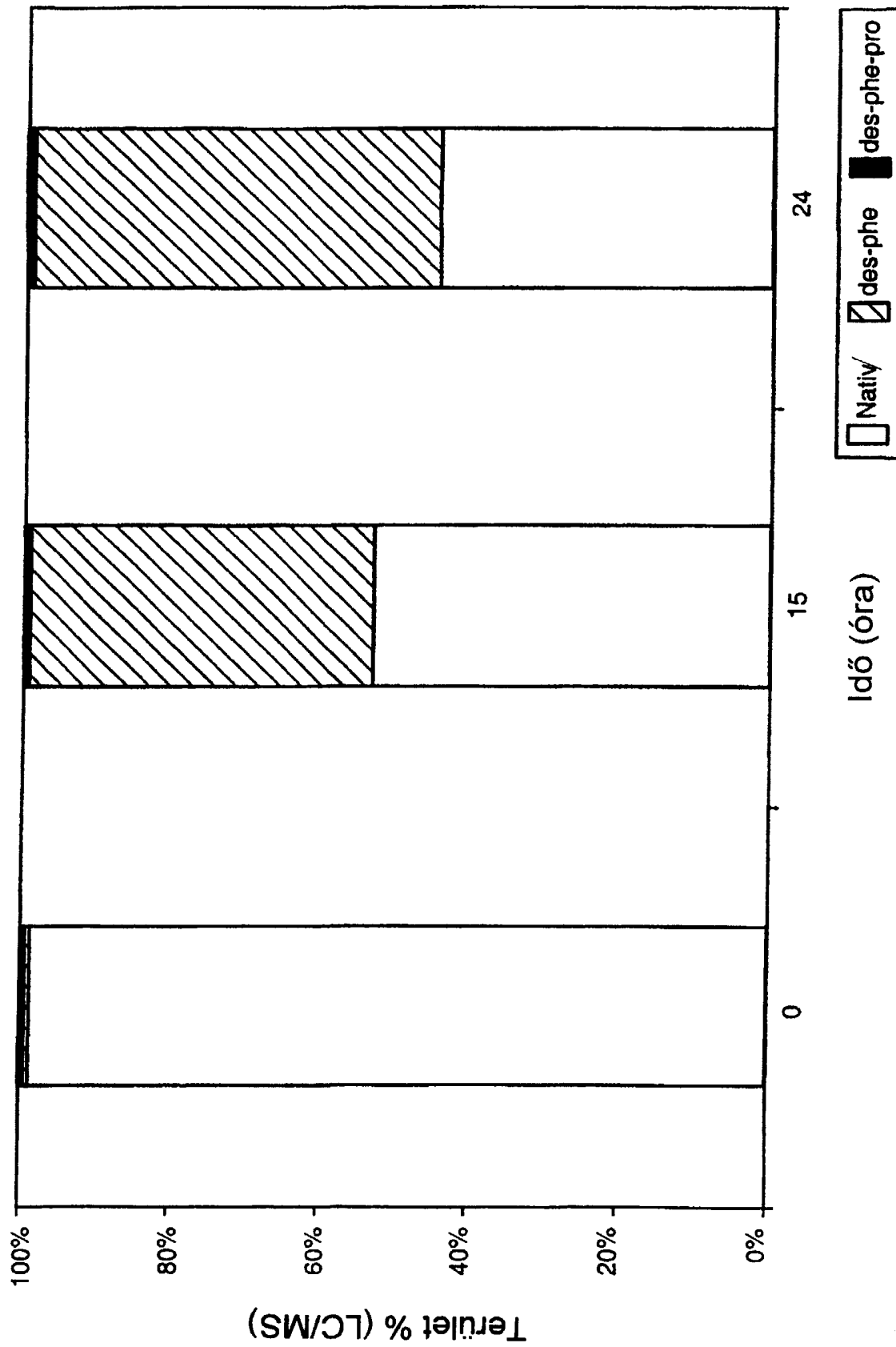
1. ábra



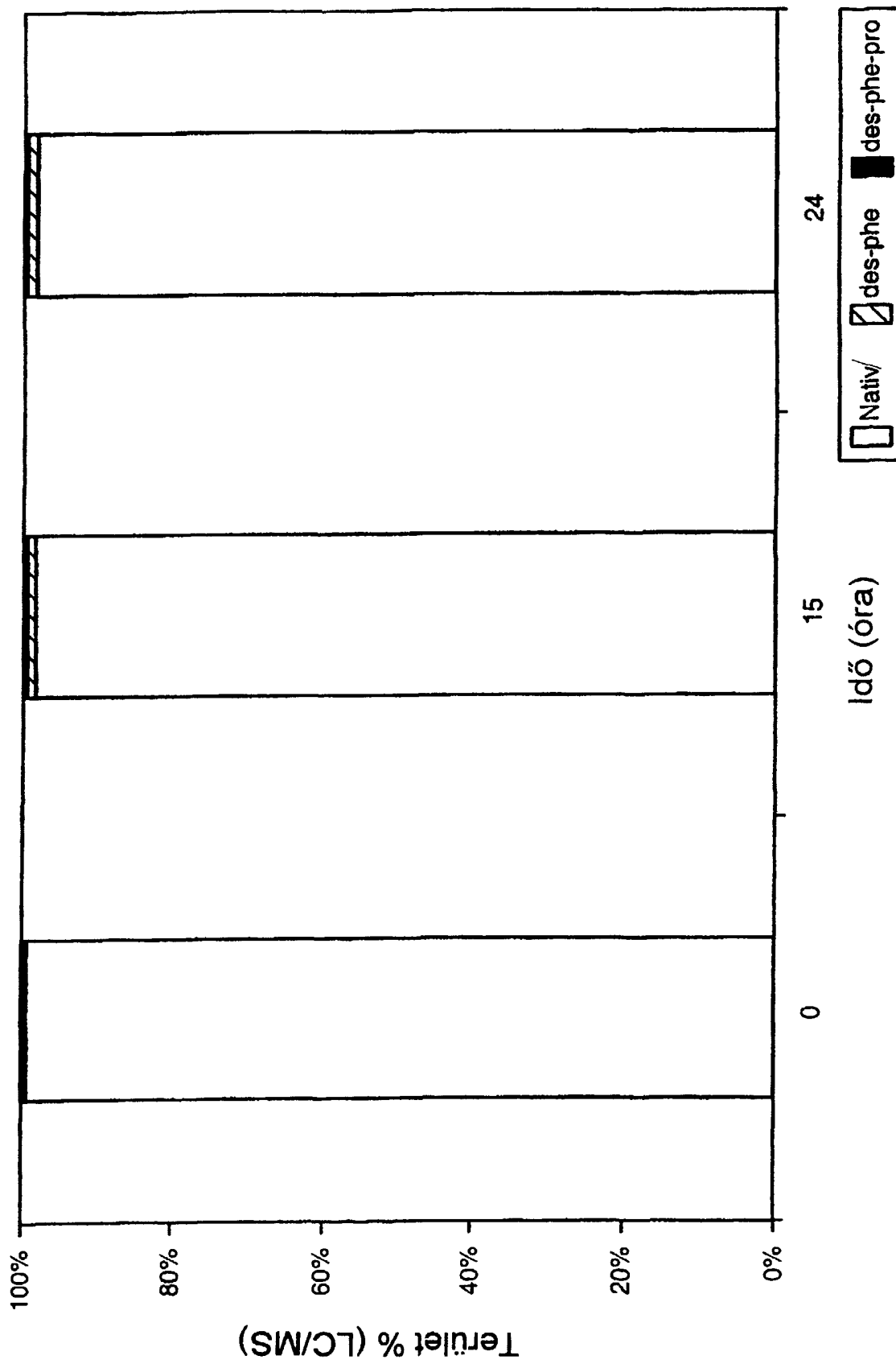
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra