



HU000230065B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **230 065**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 03892**(22) A bejelentés napja: **2001. 12. 07.**(40) A közzététel napja: **2004. 03. 01.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2015. 06. 29.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/57** (2006.01)**C12N 1/20** (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C12P 21/02** (2006.01)**C12N 9/52** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 01/47581

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0248376

(30) Elsőbbségi adatok:

60/256,162**2000. 12. 14.****US**

(73) Jogosult(ak):

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

(72) Feltaláló(k):

Chen, Christina Yu-Ching, Hillsborough, Kalifornia (US)

(74) Képviselő:

**Advopatent Szabadalmi és Védjegy Iroda,
Budapest**

(54)

Baktérium gazdatörzsek

(57) Kivonat

A találmány tárgyát E. coli törzs képezi, amely a DegP-proteázt kódoló kromoszómális degP-gén és a Prc-proteázt kódoló kromoszómális prc-gén vonatkozásában deficiens, és olyan mutáns spr-gént tartalmaz, amely szuppresszállja a prc-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusát. A találmány szerinti E. coli törzs előnyösen tartalmaz egy, a törzsre nézve heterológ polipeptidet kódoló nukleinsavat, amely lehetővé teszi a heterológ polipeptid termelését.

Baktérium gazdatörzsek

A találmány tárgyát proteolízis-deficiens baktérium gazdatörzsek, közelebbről, olyan gazdatörzsek képezik, amelyek nem képesek a heterológ polipeptidek lebontására, ezáltal javítják az ilyen polipeptidek kitermelését.

Ismeretesek olyan *E. coli* törzsek, amelyekből hiányoznak a proteázok, illetve a proteázok szabályozásáért felelős gének [ld. pl. Beckwith és Strauch, WO 88/05821 számú nemzetközi közzétételi irat; Chaudhury és Smith: *J. Bacteriol.* 160, 788-791 (1984); Elish és mtsai.: *J. Gen. Microbiol.* 134, 1355-1364 (1988); Baneyx és Georgiou, "Expression of proteolytically sensitive polypeptides in *Escherichia coli*," In: *Stability of Protein Pharmaceuticals*, 3. kötet: „Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation”, 69-108. old., szerk.: Ahern és Manning (Plenum Press, New York, 1992)].

E törzsek közül néhányat proteolízisre érzékeny proteinek (elsősorban gyógyászati vagy kereskedelmi jelentőségű proteinek) hatékony előállítására alkalmaztak. Georgiou és mtsai. (5 508 192 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) számos proteáz-deficiens és/vagy hősokk-protein-deficiens baktérium gazdatörzset tártak fel, melyek közé

egyszeresen, kétszeresen, háromszorosan és négyszeresen proteáz-deficiens baktériumok, illetve olyan, egy proteázos baktériumok tartoznak, amelyek az *rpoH*-génben is hordoznak mutációt. A Georgiou és mtsai. által feltárt proteáz-deficiens törzsek példái közé tartoznak azok, amelyekből hiányzik a *degP*-, *ompT*-, *ptr3*- és/vagy *prc*- (*tsp*-) gén, illetve megemlíthető még egy *depP rpoH E. coli* törzs, amelyről leírták, hogy nagy mennyiségű rekombináns protein termeltetésére alkalmas. Park és mtsai. [Biotechnol. Prog. 15, 164-167 (1999)] szintén leírták, hogy a két sejtburrok-proteáz (*degP*, *prc*) vonatkozásában deficiens törzs (HM114) valamivel gyorsabban szaporodott és nagyobb mennyiségű fúziós proteint termelt, mint a több proteázra nézve deficiens egyéb törzsek. Feltárták, hogy ez a törzs állandó pH-n végzett „visszatáplálásos” tenyésztés alkalmazásával 29 óra alatt 47,86 g/L sejtszáraztömegre szaporodott fel. Az e törzs által termelt fehérje a protein-A- β -laktamáz fúziós protein, amely 30 %-kal nagyobb β -laktamáz-aktivitást nyújt, mint a szülői KS272-törzs által termelt fehérje.

A *Prc*-proteint elsőként Hara és mtsai. [J. Bacteriol. 173, 4799 (1991)], olyan periplazmikus proteázként írták le, amely a periplazmikus penicillin-kötő protein-3 (PBP3) C-terminálisát hasítja. Később a *Prc*-proteint egy nem poláros C-terminális véget szelektíven lebontó proteázként azonosították, és *Tsp*-re nevezték át [Silber és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 295 (1992)]. A *prc*-génről bebizonyosodott, hogy egy 75 kD molekulatömegű proteint kódol, amelyre a sejtek kombinált hő- és ozmotikus stressz elleni

védelmének biztosítására van szükség (Hara és mtsai., ld. fentebb). Kimutatták továbbá, hogy a C-terminális szekvenciák határozzák meg a szubsztrát-preferenciát [ld. Keiler és mtsai.: *Protein Sci.* 4, 1507 (1995)]. A hasítás mértéke érzékeny a szubsztrátprotein C-terminálisán lévő aminosavak és funkciós csoportok azonosságára. A szabad δ -karboxilcsoport jelenléte lényeges annak megállapítása szempontjából, hogy a nem poláros C-terminális szekvenciákat tartalmazó, egymással közeli rokon peptideket a Prc hatékonyan képes-e hasítani.

A Prc homológjait különböző prokarióta-csoportokban azonosították, ideértve számos *Cyanobacterium*-ot [Brand és mtsai.: *Plant Mol. Biol.* 20, 481 (1992); Shestakov és mtsai.: *J. Biol. Chem.* 269, 19354 (1994)], a *Neisseria gonorrhoeae*-t [Black és mtsai.: *J. Bacteriol.* 177, 1952 (1995)], a *Haemophilus influenzae*-t [Fleishman és mtsai.: *Science* 269, 496 (1995)], és a *Bartonella bacilliformis* (GenBank nyilvántartási száma: L37094). A Prc-proteincsaládban egy domén hasonló a retinol-kötő proteinek egyik doménjéhez, ami arra utal, hogy e fehérjékre közös „folding”-domén jellemző, amely hidrofób szubsztrátok számára alakíthat ki kötőzsebet [Silber és mtsai., ld. fentebb; Shestakov és mtsai., ld. fentebb].

Hara és mtsai. (ld. fentebb) felismerték, hogy a Aprc-mutánsok hőrezisztens revertánsai extragénus szuppresszor (spr) mutációkat tartalmaznak. Ezenfelül, Hara és mtsai. a vad típusú spr-génterméket a burokfehérje („envelope”) frakció lipoproteínjeként azonosították. Feltételezték,

hogy a vad típusú spr-gén peptidoglikán-hidrolizáló enzimet kódolhat [Hara és mtsai.: Microbial Drug Resistance 2, 63 (1996)]. Olyan esetekben, amikor az spr-gén prc+ háttérben nem volt működőképes, az spr-mutáció szuppresszorát PBP7-nek (egy másik penicillin-kötő protein) azonosították [Hara és mtsai. (1996), ld. fentebb]. Hara és mtsai. leírták az spr-gén klónozását és egy olyan Aprc-mutáns előállítását, amelyben az Spr-proteint nem bontja le a proteáz [ld. Hara és mtsai.: „Abstract for Table Ronde Roussel Uclat” no. 86, Versailles, 1997. május], és a szerzők arra a megállapításra jutottak, hogy a prc és az spr kölcsönös szuppresszorok.

Az *E. coli* egy prc- (tsp-) null törzsének kondicionális letális fenotípusának alkalmazásával három sokkópiás prc-szuppresszort is azonosítottak [Bass és mtsai.: J. Bacteriol. 178, 1154-1161 (1996)], melyek közül egy sem bizonyult az spr-génnel rokonságban állónak. E szuppresszorok egyike csoportját két tandem elhelyezkedésű, feltételezett proteáz-gén alkotja, melyek a kromoszómán 72,5 percre térképezhetők egymástól. Ezek a gének htrA-homológok, és a HtrA (DegP) szerin-proteázzal 58 %-ban, illetve 35 %-ban azonos proteínt kódolnak. Egy másik típusú, azonosított szuppresszor a dksA (dnak-szuppresszor) gén, amely a dank, dnaJ és grpE hősokk-gének sokkópiás szuppresszora. A dksA-gént, az előzőektől függetlenül, egy mukB-mutáció sokkópiás szuppresszoraként izolálták, amely a kromoszómális megosztáshoz szükséges. A harmadik típus egy lerövidült lipoprotein-A (xlpA) gén.

A *degP*-gén funkciója a DegP (HtrA) sejtburrok-proteáz szintézisének szabályozása. Beckwith és Strauch (ld. fentebb) elsőként hoztak létre *degP*-deficiens mutánst, amelyet rekombinációval *E. coli* kromoszómába építettek be. A HtrA (molekulatömege kb. 500 kD) egy hősokk-protein, amelynek proteolitikus aktivitása nélkülözhetetlen az *E. coli* magas hőmérsékletű körülmények közötti (42 °C felett) életben maradásához [Shorko-Glonek és mtsai.: *Gene* 163, 47 (1995)]. A *degP*-mutációval számos - rendszerint nem stabil - sejtmembrán-protein stabilizálható [Strauch és Beckwith: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1676 (1988)]. Később a HtrA-proteinnről leírták, hogy - elektronmikroszkópos és kémiai kereszttekési analízis eredményei alapján - dodekamerként viselkedik, amely hexamer gyűrűk két halmazából áll [Kim és mtsai.: *J. Mol. Biol.* 294, 1363 (1999)]. A HtrA kettős gyűrű alakú belső kamrájába (ahol a peptidkötések hasítása bekövetkezhet) történő bejutás szempontjából kulcsfontosságú a protein-szubsztrátok „kigombolyítása” („unfolding”) [Kim és mtsai., ld. fentebb].

Különböző proteáz-deficiens törzsekben számos heterológ polipeptidet termeltettek, azonban e törzsek többsége viszonylag alacsony termék-koncentrációt és/vagy gyenge szaporodási rátát eredményezett. Ennek megfelelően, olyan proteáz-deficiens baktériumtörzsek létrehozására van szükség, amelyek nem hasítják a terméket és nagy termék-koncentrációt eredményeznek.

A fentiek alapján, a találmány egyik szempontjának megfelelően, olyan *E. coli* törzseket tárunk fel, amelyek a DegP-,

illetve Prc-proteint kódoló kromoszómális degP- és prc-gén vonatkozásában deficiensek, ugyanakkor, olyan mutáns spr-gént tartalmaznak vagy hordoznak, amelynek terméke szuppresszálja a prc-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusát. A találmány szerinti törzs a proteáz-III-at kódoló kromoszómális ptr3-gén és/vagy az OmpT-proteint kódoló kromoszómális ompT-gén vonatkozásában előnyösen nem deficiens. A találmány szerinti *E. coli* törzset előnyösen a mutáns spr-gén degPA,prcA-törzsbe (génsebészeti módszerekkel) történő bejuttatásával hoztuk létre, hogy a stationárius fázisban biztosítsuk a nagy sejtsűrűségű *E. coli* fermentációs folyamatot.

A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében az *E. coli* törzs heterológ polipeptidet - előnyösen proteolitikus hasításra érzékeny polipeptidet, még előnyösebben eukarióta polipeptidet - kódoló nukleinsavat tartalmaz.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében eljárást tárunk fel heterológ (azaz a baktériumtörzsre nézve heterológ) polipeptid előállítására, melynek során, első lépésként, egy *E. coli* törzset tenyésztünk, amely Prc-proteázt kódoló kromoszómális prc-génre nézve deficiens, ugyanakkor, mutáns spr-gént hordoz vagy tartalmaz, mely spr-gén terméke szuppresszálja a prc-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusát, továbbá tartalmaz egy heterológ polipeptidet kódoló nukleinsavat is. A tenyésztést úgy hajtjuk végre, hogy előidézzük a nukleinsav expresszióját. Az eljárás második lépésként a polipeptidet

kinyerjük a törzsből (a sejtek citoplazmájából, periplazmájából vagy a tenyésztő tápközegből, előnyösen a periplazmából vagy a tenyésztő tápközegből, legelőnyösebben a teljes fermentációs táplevesből). A találmány szerinti eljárás során polipeptidként előnyösen Apo2-ligandumot vagy antitestet (ideértve az antitest-fragmenst is) termeltek.

A következőkben az ábrák rövid leírását ismertetjük.

Az 1/A-1/E ábrákon az anti-VEGF Fab-fragmens előállítására alkalmas pY0317-plazmid létrehozásához szükséges expressziós kazetta teljes nukleotidszekvenciáját (1. azonosítószámú szekvencia), illetve az általa kódolt aminosav-szekvenciát (2. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be. A félkövér betűtípussal szedett aminosavak az eredeti egéreredetű A.4.6.1 antitest komplementaritást meghatározó régiójának (CDR) aminosavait jelölik. A dőlt betűvel, illetve aláhúzással jelölt aminosavak az antigén megkötéséért felelős egérereditű vázrégió-aminosavak.

A 2. ábrán a pY0317-plazmid diagramját (2/A ábra), illetve a pY0317tet20-plazmid előállítását szemléltetjük (2/A és 2/B ábra).

A 3. ábrán a pAPo2-P2RU plazmid-diagramját mutatjuk be.

A 4. ábrán a humán Apo-2-ligandum cDNS nukleotidszekvenciáját (3. azonosítószámú szekvencia) és az abból leszármaztatott aminosav-szekvenciát (4. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be. A 3. azonosítószámú szekvencia 447. pozíciójában lévő „N” azt jelzi, hogy az adott pozíci-

óban „T” és „G” egyaránt előfordulhat.

Az 5. ábrán az *E. coli* 59A7-, 49A5- és 43H1-törzs le-
származtatásának diagramja látható.

A 6. ábrán a - heterológ polipeptidként rhuFab'2 anti-
CD18-LZ fúziós proteint expresszáló - 49A5-törzsből (prc+
törzs) származó fermentációs sejtüledék kétdimenziós
gélelektroforézisének eredményét mutatjuk be. Valamennyi
könnyű lánc-eredetű foltot bekarikáztuk.

A 7. ábrán a - heterológ polipeptidként rhuFab'2 anti-
CD18-LZ fúziós proteint expresszáló - 43H1-törzsből („prc-”
törzs) származó fermentációs sejtüledék kétdimenziós
gélelektroforézisének eredményét mutatjuk be. Ezen a gélen
a könnyű lánc hasítási termékei eltűntek.

A 8. ábrán AME5™/reverz fázisú oszlopok alkalmazásá-
val végzett analízissel felbontott öt csúcs látható, melyek
lehetővé teszik az rhuFab'2-LZ (xCD18) antitest-fragmensek
megoszlásának összehasonlítását. Az y-tengelyen az 1-5.
csúcsok specifikus csúcs alatti területe, míg az x-
tengelyen három rhuFab'2-LZ (xCD18) antitest-fragmenst ter-
melő törzs, a 43H1 (prc-), 49A5 (prc+) és 58H2 (prc-
javított 43H1-törzs) látható. A vastagon keretezett szürke
oszlop az LC-115 könnyű lánc fragmenst, a fekete oszlop a
könnyű láncot, a fehér oszlop a könnyű lánc dimert, a véko-
nyan sávozott oszlop Fab-szerű molekulát, a vastagon sávo-
zott oszlop pedig az Fab'2-LZ-t reprezentálja. Jól látható,
hogy az 1. csúcs (LC-115) a prc-deleció törzsből eltűnt.

A 9. ábrán mutáns spr-gén nélküli prc-negatív törzs
(pS1130-plazmiddal transzformált 58B3-törzs; fekete négyze-

tekkel jelölve) és mutáns spr-gént hordozó prc-negatív törzs (pS1130-plazmiddal transzformált 59A7-törzs; fehér rombuszokkal jelölve) standard nagy sejtsűrűségű fermentációs szaporodási görbéje látható. Az eredményeket OD₅₅₀-értékként fejeztük ki (a fermentációs idő függvényében).

A 10. ábrán a humanizált anti-CD18 kappa könnyű lánc aminosav-szekvenciáját (5. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, feltüntetve a kijelölt könnyű lánc bomlástermékek számított pI-értékeit. A törtvonallal jelölt hasítási helyek valódiságát tömegspektrometriával igazoltuk (ld. 3. táblázat).

A 11. ábrán hét sávós gél fényképe látható, melyet különböző gazdasejtek és három proteíntípus alkalmazásával készítettünk. Az ábrán látható, hogy a 20 kD-os könnyű lánc fragmens (LC 182) az anti-VEGF Fab és szöveti faktor elleni Fab'2-LZ fúziós molekulákat expresszáló 43H1 (prc-negatív) sejtekben hiányzik. 1. sáv: szöveti faktor elleni F(ab')2-LZ-6xHis, 33B16-gazdatörzs; 2. sáv: szöveti faktor elleni F(ab')2-LZ-6xHis, 43H1-gazdatörzs; 3. sáv: anti-CD18 F(ab')2-LZ-6xHis, 49A5-gazdatörzs; 4. sáv: anti-CD18 F(ab')2-LZ-6xHis, 41H1-gazdatörzs; 5. sáv: pBR322-plazmid, 49A5-gazdatörzs; 6. sáv: anti-VEGF Fab, 43H1-gazdatörzs; 7. sáv: anti-VEGF Fab, 43E7-gazdatörzs. „HC” és „H” jelentése: nehéz lánc; „LC” és „L” jelentése: könnyű lánc.

A 12. ábrán - heterológ polipeptidként anti-VEGF Fab-t (pY0317tet20) expresszáló - 59A7-törzs (prc-negatív törzs) rázatott lombikos tenyészetéből származó sejttöledék kétdimenziós gélelektroforézisének eredményét mutatjuk be. Ezen

a gélen a prc+ sejtekben jelenlévő könnyű lánc hasítási termékek és a két nehéz lánc hasítási fragmens eltűnt. A csak az 59A7-törzsben detektált két külön nehéz lánc fragmenst szintén feltüntettük: ezek OmpT vagy Ptr3 által hasított termékek.

A 13. ábrán - heterológ polipeptidként anti-VEGF Fab-t (pY0317tet20) expresszáló - 60Cl-törzs (prc+ törzs) származó rázatott lombikos tenyészetéből származó sejtüledék két-dimenziós gélelektroforézisének eredményét mutatjuk be. Ezen a gélen több könnyű lánc hasítási fragmenst és két nehéz lánc hasítási fragmenst detektáltunk.

A következőkben a találmány előnyös megvalósítási módjait ismertetjük részletesen.

Definíciók

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

Az emlőseredetű polipeptidek jellemző példái közé tartoznak a következők: renin, növekedési hormon, mint pl. a humán növekedési hormon; szarvasmarha-eredetű növekedési hormon; növekedési hormont felszabadító faktor; mellékpajzsmirigy hormon; pajzsmirigy-stimuláló hormon; lipoproteinek; lipoproteinek; 1-antitripszin; inzulin A-

lánc; inzulin B-lánc; proinzulin; trombopoietin; follikulusz-stimuláló hormon; kalcitonin; luteinizáló hormon; glukagon; véralvadási faktorok, pl. VIIIC faktor, IX. faktor, szöveti faktor és von Willebrand faktor; véralvadást gátló faktorok, pl. protein-C; atrialis natriuretikus faktor; tüdő szőrfaktáns; plazminogén aktivátor, pl. urokináz vagy humán vizelet- vagy szövet típusú plazminogén aktivátor (t-pA); bombezín; trombin; vérképzési növekedési faktor; tumornekrozis faktor- α és - β ; ErbB2-domén(ek) elleni antitestek, mint pl. a 2C4 (ld. WO 01/00245 számú nemzetközi közzétételi irat; ATCC HB-12697 hibridóma), amely az ErbB2 extracelluláris doménjében található régióhoz (pl. az ErbB2 kb. 22. aminosavától a kb. 584. aminosaváig terjedő régióban egy vagy több aminosavhoz) kötődik; enkephalináz; szérumalbumin, pl. humán szérumalbumin; müllerianosist gátló szubsztancia; relaxin A-lánc; relaxin B-lánc; prorelaxin; egérezetű gonadotropin-asszociált peptid; mikrobiális protein, pl. β -laktamáz; DNáz; inhibin; aktivin; vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF); hormonok és növekedési faktorok receptorai; integrin; protein-A vagy -D; rheumatoid faktorok; neurotroph faktor, pl. 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), pl. cardiotrophin-1 (CT-1); vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF); fibroblaszt-eredetű növekedési faktor, pl. aFGF és bFGF; epidermális növekedési faktor (EGF); transzformáló növekedési faktorok (TGF-ek), pl. TGF- α és

TGF- β , ideértve a TGF-1-et, -2-t, -3-at, -4-et és -5-öt; inzulinszerű növekedési faktor-I és -II (IGF-I és IGF-II); des(1-3)-IGF-I (agyi IGF-I), inzulinszerű növekedési faktor-kötő proteinek; CD-proteinek, pl. CD-3, CD-4, CD-8 és CD19; eritropoietin (EPO); oszteoinduktív faktorok; interferonok, pl. interferon- α , - β és - γ ; szérumalbumin, pl. humán szérumalbumin (HSA) vagy szarvasmarha-szérumalbumin (BSA); kolonizációt stimuláló faktorok (CSF-ek), pl. M-CSF, GM-CSF és G-CSF; interleukinek (IL-ek), pl. IL-1 - IL-10; anti-HER-2 antitest; Apo2-ligandum; szuperoxid dizmutáz; T-sejt-receptorok; felületi membránproteinek; lebomlást gyorsító faktor; virális antigének, pl. HIV-vírus burokprotein-jének részlete; transzportproteinek; homing-receptorok; adresszinek; szabályozóproteinek; antitestek; valamint a fentiek fragmenszei.

A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös polipeptidek közé tartoznak a következők: HSA, BSA, anti-IgE, anti-CD20, anti-IgG, t-PA, gp120, anti-CD11a, anti-CD18, 2C4, anti-VEGF, VEGF, TGF- β , aktivin, inhibin, anti-HER-2, DNáz, IGF-I, IGF-II, agyi IGF-I, növekedési hormon, relaxin-láncok, növekedési hormont felszabadító faktor, inzulin-láncok vagy pro-inzulin, NGF, NT-3, BDNF, Apo2-ligandum és urokináz. A találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyös emlőseredetű polipeptidek az antitestek, köztük a teljes hosszúságú antitestek, antitest-fragmensek és Apo2-ligandum, még előnyösebben a humán és humanizált antitestek, melyek példái a következők: anti-IgE, anti-IgG, anti-Her-2, anti-CD11a, anti-CD18, anti-

VEGF, 2C4, BSA vagy HSA; még előnyösebben az anti-CD18, anti-VEGF, szöveti faktor elleni antitest, 2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40 és anti-CD11a antitestek. A polipeptid definíciójába tartozó antitest-fragmensek például a következők: Fab, Fab', Fab'2 vagy Fab'2-leucin-cípzár (LZ); legelőnyösebben az anti-CD18 Fab'2-LZ, szöveti faktor elleni Fab'2-LZ-6His, anti-VEGF Fab, anti-CD8 Fab'2-LZ-(poli-His) és anti-CD18 Fab'2-LZ-(poli-Lys).

Ahogy a leírásban a polipeptidek vonatkozásában használjuk, a "proteolízisre érzékeny" kifejezésen olyan polipeptideket értünk, amelyek (akár natív állapotban, akár a szekréció során) hajlamosak vagy érzékenyek egy vagy több *E. coli* proteáz általi hasításra.

A "nagy sejtsűrűségű" fermentáció vagy tenyésztés kifejezésen olyan folyamatot értünk, amelynek során rendszerint először részletekben tápanyagokat adagolunk, hogy elősegítsük a sejtszaporodást, illetve, hogy a glükózagadolás szabályozására kihasználjuk az oxigénfogyasztás és a glükózfogyasztás közötti összefüggést (az oldott oxigén mennyiségének felhasználásával, amely könnyen mérhető). Nagyobb sejtsűrűség eléréséhez a tenyészethez folyamatosan ammóniát adagolhatunk, és a fermentáció bizonyos stádiumaiban - a sejtszaporodás elősegítése érdekében - további mikroelemeket (pl. P, K, S és Mg) adhatunk (részletesen ld. a példákban).

A "mutáns spr-gén, melynek terméke szuppresszálja a pro-mutánsokat hordozó törzsek fenotípusát" kifejezés *E. coli* pro-szuppresszor (spr) génre vonatkozik, amely Pro^{spr}-

proteint kódol, és amelynek szekvenciáját Hara és mtsai. [(1996), ld. fentebb] írták le, vagy amely mutagenizálva van, feltéve, hogy a géntermék a pro-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusának szuppresszoraként működik. A mutáció előnyösen egy pontmutációt foglal magában; legelőnyösebben ez a pontmutáció a W148R (a 148. pozícióban triptofán helyett arginin), amelyet egy TGG kodon CGG-re történő helyettesítése eredményez.

A találmány leírásában az "antitest" kifejezést legtágabb értelmében használjuk, s jelentése kiterjed az intakt monoklonális antitestekre, poliklonális antitestekre, többértékű antitestekre, multispecifikus antitestekre (pl. bispecifikus antitestekre), valamint az antitest-fragmensekre (ld. lentebb), feltéve, hogy azok rendelkeznek a kívánt biológiai aktivitással.

Ahogy a leírásban használjuk, a "monoklonális antitest" kifejezésen lényegében homogén antitest-populációból származó antitestet értünk, vagyis a populációt alkotó egyes antitestek - az esetlegesen kis mennyiségben előforduló természetes mutációktól eltekintve - azonosak. A monoklonális antitestek rendkívül specifikusak: egyetlen antigén ellen irányulnak. Ezen túlmenően, ellentétben a poliklonális antitestek készítményeivel, amelyek különböző determinánsok (epitópok) elleni különböző antitesteket tartalmaznak, minden egyes monoklonális antitest az antigén egyetlen determinánsa ellen irányul. A monoklonális antitestek - specifikitásukon túlmenően - azért is előnyösek, mert hibridóma-tenyésztésben, más immunglobulinoktól mente-

sen szintetizálhatók. A "monoklonális" jelző az antitest azon sajátására utal, hogy antitestek lényegében homogén populációjából nyerhető, és nem utal arra, hogy az antitest bármilyen konkrét eljárással lenne előállítható. Például, a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazandó monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással vagy rekombináns DNS-technikák (ld. pl. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) alkalmazásával állíthatók elő. A monoklonális antitestek fág antitest-könyvtárakból is izolálhatók, például, a Clackson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)] és Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] által leírt technikák alkalmazásával.

A monoklonális antitestek közé tartoznak a "kimérikus" antitestek is, amelyekben a nehéz és/vagy könnyű lánc egy része azonos vagy homológ egy adott fajból származó - vagy egy adott antitest-osztályhoz vagy -alosztályhoz tartozó - antitestek megfelelő szekvenciáival, míg a lánc(ok) többi része azonos vagy homológ egy másik fajból származó - vagy egy másik antitest-osztályba vagy -alosztályba tartozó - antitestek megfelelő szekvenciáival. A monoklonális antitestek közé tartoznak az ilyen kiméra antitestek fragmensei, feltéve, hogy képesek a kívánt biológiai aktivitás kifejtésére [4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Morrison és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984)]. A kimérikus antitestek közé tartoznak a "primatizált" antitestek is, amelyek nem humán főemlősből (pl. óvilági majmokból, farkatlan majmokból, stb.)

származó variábilis domén antigénkötő szekvenciákat tartalmaznak.

Az "antitest-fragmensek" egy teljes antitest csupán egy részletét tartalmazzák, amely előnyösen magában foglalja az antitest antigénkötő vagy variábilis régióját. Az antitest-fragmensek példáulként említhetők a következők: Fab-, Fab'-, $F(ab')_2$ - és Fv-fragmensek; diatestek; lineáris antitestek; egyláncú antitest-molekulák; és antitest-fragmens(ek)ből álló multispecifikus antitestek.

Az "intakt" antitest kifejezés olyan antitestre vonatkozik, amely antigénkötő variábilis régiót, valamint könnyű lánc konstans domént (C_L) és nehéz lánc konstans doméneket (C_H1 , C_H2 és C_H3) tartalmaz. A konstans domének natív szekvenciájú konstans domének (pl. humán natív szekvenciájú konstans domének) vagy azok aminosav-szekvencia változatai lehetnek. Az intakt antitest előnyösen egy vagy több effektor-funkció kifejtésére képes.

Az antitestek "effektor-funkciói" kifejezésen olyan biológiai aktivitásokat értünk, amelyek egy antitest Fc-régiójának (natív szekvenciájú Fc-régióinak vagy módosított aminosav-szekvenciájú Fc-régióinak) tulajdoníthatók. Az antitestek effektor-funkcióinak jellemző példái a $C1q$ -kötődés, komplement-dependens citotoxicitás, Fc-receptor-kötődés, antitest-dependens sejtközvetítette citotoxicitás (AFCC), fagocitózis, sejtfelületi receptorok (pl. B-sejtreceptor; BCR) gátlása, stb.

Az intakt antitestek - nehéz láncuk konstans doménjének aminosav-szekvenciájától függően - különböző

"osztályokba" sorolhatók. A teljes antitestek öt fő osztálya létezik: IgA, IgD, IgE, IgG és IgM, melyek közül több további "alosztályokra" (izotípusokra) osztható, pl. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA és IgA2. A különböző antitest-osztályoknak megfelelő nehéz lánc konstans domének elnevezése a következő: α , δ , ϵ , γ , illetve μ . A különféle Ig-osztályok alegység-szerkezete és háromdimenziós konfigurációja szakember számára jól ismert.

Az "antitest-dependens sejtközvetítette citotoxicitás" (vagy "ADCC") kifejezésen olyan sejtközvetítette reakciót értünk, amelynek során Fc-receptorokat termelő, nem specifikus citotoxikus sejtek - pl. természetes ölósejtek (NK-sejtek), neutrofilek és makrofágok - egy célsejthez kötődött antitestet ismernek fel, majd a célsejt lizisét okozzák. Az ADCC közvetítésében elsőrendű sejtek (NK-sejtek) csak Fc γ RIII-receptorokat expresszálnak, míg a monociták Fc γ RI-et, Fc γ RII-t és Fc γ RIII-at egyaránt expresszálnak. A vérképzési őssejtek FcR-termelését Ravetch és Kinet cikkének 3. táblázatában, a 464. oldalon [Annu. Rev. Immunol. 9, 457-492 (1991)] foglalják össze. Egy vizsgált molekula ADCC-aktivitásának meghatározására *in vitro* ADCC-teszt alkalmazható (ld. pl. az 5 500 362 vagy 5 821 337 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). Az ilyen vizsgálati eljárásokban alkalmazható effektor sejtek közé tartoznak a perifériás vér egymagvú sejtjei (PBMC) és a természetes ölósejtek (NK-sejtek). Más módon - vagy ezen túlmenően - egy adott molekula ADCC-aktivitása *in vivo* is tesztelhető, például állatmodell alkalmazásával [ld. Clynes és mtsai.:

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95, 652 (1998)].

A "humán effektor sejtek" olyan leukociták, amelyek egy vagy több Fc-receptort termelnek és effektor-funkciókat töltenek be. Az ilyen sejtek előnyösen legalább Fc γ RIII-at termelnek és ADCC effektor-funkciót töltenek be. Az ADCC-t közvetítő humán leukociták példái közé tartoznak a perifériás vér egymagvú sejtjei (PBMC), a természetes ölósejtek (NK), a monociták, citotoxikus T-sejtek és neutrofilek, melyek közül - a találmány szerinti megoldás szempontjából - a PBMC-k és az NK-sejtek előnyösek. Az effektor sejtek természetes forrásukból (pl. vérből vagy PBMC-kből), a leírásban ismertetett módon izolálhatók.

A "natív antitestek" rendszerint kb. 150 000 Dalton molekulatömegű heterotetramer glikoproteinek, amelyek két azonos könnyű (L) láncból és két azonos nehéz (H) láncból állnak. Mindkét könnyű lánc egy kovalens diszulfid-kötéssel kapcsolódik a nehéz lánchoz, míg a különböző immunglobulinizotípusokban a nehéz láncok között eltérő számú diszulfid-kötés található. A nehéz és könnyű láncokban, egymástól szabályos távolságokra, láncon belüli diszulfid-kötések helyezkednek el. Mindkét nehéz lánc egyik végén variábilis domén (V_H) található, melyet számos konstans domén követ. A könnyű láncok egyik végén variábilis domén (V_L), másik végén konstans domén helyezkedik el; a könnyű lánc konstans doménje a nehéz lánc első konstans doménjével, míg a könnyű lánc variábilis doménje a nehéz lánc variábilis doménjével illeszkedik. Úgy tartják, hogy a nehéz és a könnyű lánc variábilis doménjei között bizonyos aminosavak határfelületet

képeznek.

Az antitestekkel összefüggésben használt "variábilis" kifejezés arra vonatkozik, hogy a variábilis domén bizonyos részeinek aminosav-szekvenciája az egyes antitestekben nagymértékben eltér egymástól, és ezek a szakaszok felelősek az adott antitest adott antigénre vonatkozó specifikusságáért. Mindazonáltal, a variabilitás az antitest variábilis doménjeiben nem egyenletesen oszlik meg, hanem három szakaszra koncentrálódik: ezek az úgynevezett hipervariábilis régiók, amelyek a könnyű lánc és a nehéz lánc variábilis doménjeiben egyaránt megtalálhatók. A variábilis domén konzerváltabb szakaszait vázrégióknak (FR) nevezzük. A natív antitestek nehéz és könnyű láncainak variábilis doménjei egyenként négy vázrégiót (FR1, FR2, FR3 és FR4) tartalmaznak (melyek többnyire β -redős konfigurációt vesznek fel), és ezeket három hipervariábilis régió köti össze, melyek hurkokat képeznek, és ezek a hurkok kapcsolják össze a β -redős struktúrát (és néhány esetben annak részét is képezik). Az egyes láncokban a vázrégiók szorosan összetartják a hipervariábilis régiókat, melyek - a másik láncban lévő hipervariábilis régiókkal együtt - az antitest antigénkötő helyeinek létrehozásában játszanak szerepet [ld. Kabat és mtsai.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. kiadás, 647-669. old., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]. A konstans domének közvetlenül nem játszanak közre az antitest antigénhez történő kötődésében, azonban különféle effektor-funkciókat töltenek be - pl. az antitest

részvétele az antitest-dependens celluláris citotoxicitás-ban (ADCC).

Ahogy a leírásban használjuk, a "hipervariábilis régió" kifejezésen egy antitest antigénkötésért felelős aminosavaiból álló régiót értünk. A hipervariábilis régió általában "komplementaritást meghatározó régióból" (CDR) származó aminosavakat tartalmaz - azaz a könnyű lánc variábilis doménjének 24-34. aminosavait (L1), 50-56. aminosavait (L2) és 89-97. aminosavait (L3), valamint a nehéz lánc variábilis doménjének 31-35. aminosavait (H1), 50-65. aminosavait (H2) és 95-102. aminosavait (H3) [ld. Kabat és mtsai.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. kiadás, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] -, és/vagy "hipervariábilis hurokból" származó aminosavakat [azaz a könnyű lánc variábilis doménjének 26-32. aminosavait (L1), 50-52. aminosavait (L2) és 91-96. aminosavait (L3), valamint a nehéz lánc variábilis doménjének 26-32. aminosavait (H1), 53-55. aminosavait (H2) és 96-101. aminosavait (H3); Chothia és Lesk: J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)] tartalmaz. A vázrégiót alkotó aminosavak a variábilis domén azon aminosavai, amelyek nem a hipervariábilis régió részét képezik.

Az antitestek papainos emésztése két azonos antigénkötő fragmenst (Fab-fragmensek, melyek egy-egy antigénkötő helyet tartalmaznak), valamint egy maradék Fc-fragmenst eredményez, amelynek neve kristályosodási hajlamát ("crystallize") tükrözi. A pepszines emésztés eredményeként $F(ab')_2$ -fragmens jön létre, amely két antigén-

kombinálódási helyet tartalmaz, és képes az antigén kereszttekötésére.

Az "Fv-fragmens" az a minimális antitest-fragmens, amely komplett antigén-felismerő és -kötő helyet tartalmaz. Ez a régió egy nehéz lánc variábilis domén és egy könnyű lánc variábilis domén dimere, amelyben a domének nem kovalens kötással vannak szorosan egymáshoz kapcsolva. Ez a konfiguráció teszi lehetővé, hogy az egyes variábilis doménekben a három-három hipervariábilis régió interakcióba lépve a V_H - V_L dimer felületén antigénkötő helyet hozzon létre. A hat hipervariábilis régió együttesen biztosítja az antitest antigénkötő specifitását, azonban egyetlen variábilis domén (vagy egy Fv-fragmens fele, amely csak három, antigénre specifikus hipervariábilis régiót tartalmaz) is képes az antigén felismerésére és megkötésére (bár kisebb affinitással, mint a teljes kötőhely).

A Fab-fragmens tartalmazza a könnyű lánc konstans doménjét és a nehéz lánc első konstans doménjét (CH1) is. A Fab'-fragmens annyiban tér el a Fab-fragmenstől, hogy a nehéz lánc CH1-doménjének C-terminálisán néhány plusz aminosavat tartalmaz (köztük a az antitest csukló- ("hinge") régiójának egy vagy több ciszteinjét). A Fab'-SH olyan Fab'-fragmens, amelyben a konstans domének ciszteinje(i) szabad tiolcsoportokat tartalmaznak. Az $F(ab')_2$ -fragmenst eredetileg Fab'-fragmensek párjaként állították elő, a két Fab'-fragmens között csukló-régióból származó ciszteinekkal. Az antitest-fragmensek egyéb kémiai kapcsolásai szintén ismeretesek.

A gerinces fajokból származó antitestek (immunoglobulinok) "könnyű láncai" - konstans doménjeik aminosav-szekvenciája alapján - a két eltérő típus (κ és λ) egyikébe sorolhatók.

Az "egyláncú Fv" vagy "scFv" antitest-fragmensek egy antitest V_H - és V_L -doménjeit egyazon polipeptid-láncon tartalmazzák. Az Fv-polipeptid a V_H - és V_L -domén között általában kapcsolópolipeptidet is tartalmaz, amely az scFv-fragmens számára lehetővé teszi az antigén megkötéséhez szükséges struktúra kialakítását. Az scFv-fragmensek összefoglaló áttekintését illetően ld. Pluckthun: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113, 269 (1994). Az anti-ErbB2 antitestek scFv-fragmenseit a WO 93/16185 számú nemzetközi közzétételi iratban és az 5 571 894 és 5 587 458 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel.

A "diatest" kifejezés két antigénkötő helyet tartalmazó, kisméretű antitest-fragmensekre vonatkozik, amelyek egyazon polipeptid-láncon könnyű lánc variábilis doménhez (V_L) kapcsolt nehéz lánc variábilis domént (V_H) tartalmaznak (V_H - V_L). Az ugyanazon láncon lévő két domén közötti párosodás bekövetkezéséhez túl rövid kapcsolószekvencia alkalmazásával a domének arra vannak kényszerítve, hogy egy másik lánc komplementer doménjeivel alkossanak párt, miáltal két antigénkötő hely jön létre. A diatestek részletesebb leírását illetően ld. az EP 404 097 számú európai szabadalmi leírást és a WO 93/11161 számú nemzetközi közzétételi iratot; valamint Hollinger és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 (1993)].

A nem humán (pl. rágcsálóeredetű) antitestek "humanizált" alakjai olyan kimerikus antitestek, amelyekben a nem humán immunglobulinból származó szekvenciák aránya minimális. A humanizált antitestek nagyobb részükben olyan humán immunglobulinok (recipiens antitest), amelyekben a recipiens antitest hipervariábilis régiójának aminosavai egy nem humán fajból (pl. egérből, patkányból, nyúlból vagy nem humán főemlősből) származó antitest (donor antitest) kivánt specifitású, affinitású és kapacitású hipervariábilis régiójának aminosavaival vannak helyettesítve. Néhány esetben a humán immunglobulin vázrégiójának (FR) aminosavai nem humán immunglobulin megfelelő aminosavaival vannak helyettesítve. Ezenfelül, a humanizált antitestek olyan aminosavakat is tartalmazhatnak, amelyek nem találhatók meg sem a recipiens, sem a donor antitestben. Ezek a módosítások az antitest további finomítása céljából hajthatók végre. A humanizált antitest általában egy - jellemzően két - variábilis domén lényegében egészét tartalmazza, mely(ek)ben a hipervariábilis régiók mindegyike vagy lényegében mindegyike megfelel egy nem humán immunglobulin hipervariábilis régióinak, és a vázrégiók mindegyike vagy lényegében mindegyike megfelel egy humán immunglobulin-szekvencia vázrégiójának. A humanizált antitest, adott esetben, egy immunglobulin (jellemzően egy humán immunglobulin) konstans régiójának (Fc) legalább egy részét is tartalmazza. További részleteket illetően ld. Jones és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Presta: Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593 (1992).

Az "izolált" antitest kifejezés egy - természetes környezetében megtalálható - komponenstől elválasztott és/vagy elkülönített antitestre vonatkozik. A természetes környezetben megtalálható szennyező komponensek akadályoznák az antitest diagnosztikai vagy gyógyászati felhasználását; az ilyen komponensek közé tartoznak az enzimek, hormonok és egyéb - proteinszerű vagy nem proteinszerű - oldott anyagok. A találmány előnyös megvalósítási módjai értelmében az antitest tisztításának mértéke a következő: (1) a Lowry-eljárással végzett meghatározás szerint 95 m/m%-nál nagyobb, legelőnyösebben 99 m/m%-nál nagyobb tisztaság; (2) forgócsészés ("spinning cup") szekvenátor alkalmazásával legalább 15 aminosavas N-terminális vagy belső aminosav-szekvencia kinyeréséhez szükséges tisztaság; vagy (3) redukáló vagy nem redukáló feltételekkel végzett SDS-PAGE-analízissel (Coomassie-kék vagy, előnyösen, ezüst festés alkalmazásával) elérhető homogenitásnak megfelelő tisztaság. Az izolált antitest kifejezés jelentése kiterjed a rekombináns sejtekben *in situ* megtalálható antitestekre, mivel az ilyen sejtekben a polipeptid természetes környezetének legalább egy komponense hiányzik. Mindazonáltal, az izolált polipeptideket általában legalább egy tisztítási lépést követően kapjuk.

Az expressziós "szabályozószekvencia" kifejezésen olyan DNS-szekvenciát értünk, amely a hozzá működőképesen kapcsolt kódolószekvencia adott gazdaszervezetben történő expresszáltatásához szükséges. A prokarióta gazdasejtek számára megfelelő szabályozószekvencia, például, a

promóter, adott esetben az operátor-szekvencia, valamint a riboszóma-kötőhely.

Egy nukleinsav akkor van "működőképesen kapcsolva", ha egy másik nukleinsav-szekvenciával funkcionális kapcsolatban van. Például, egy pre-szekvencia vagy szekréción vezetőszekvencia DNS-e akkor van működőképesen egy polipeptidet kódoló DNS-hez kapcsolva, ha olyan pre-proteinként expresszálódik, amely részt vesz a polipeptid szekréciónjában. Egy promóter akkor van működőképesen egy kódolószekvenciához kapcsolva, ha befolyásolja a szekvencia transzkripcióját. Egy riboszóma-kötőhely akkor van működőképesen egy kódolószekvenciához kapcsolva, ha elősegíti a transzlációt. A "működőképesen kapcsolt" kifejezés általában azt jelenti, hogy az összekapcsolt DNS-szekvenciák egymással határosak, és - szekréción 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 oligonukleotid-adapterek vagy kapcsolószekvenciák alkalmazhatók.

A leírásban a "sejt", "sejtvonal" és "sejttenyészet" kifejezéseket egymás szinonimáiként alkalmazzuk, és valamennyi ilyen megjelölés magában foglalja az utódokat. Ilyenformán, a "transzformáns" és "transzformált sejt" kifejezések jelentése kiterjed az elsődleges, eredeti sejtre és a belőle származó tenyészetekre (függetlenül az átváltások számától). Az utódsejtek DNS-tartalmukban nem pontosan egyformák, ami a szándékos vagy véletlenszerű mutációk kö-

vetkezménye. A funkciójuk és biológiai aktivitásuk tekintetében azonos mutáns utódok szintén e kifejezés jelentéskörébe tartoznak. Eltérő meghatározások esetén az adott kifejezés jelentése a szövegösszefüggésből lesz érthető.

A találmány szerinti megoldás kiviteli módjai

A találmány értelmében olyan *E. coli* törzseket tárunk fel, amelyek DegP- és Prc-proteázt kódoló kromoszómális degP-, illetve prc-gén vonatkozásában deficiensek, ugyanakkor mutáns spr-gént hordoznak, melynek terméke szuppresszálja a prc-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusát. A találmány szerinti *E. coli* törzs, adott esetben, a proteáz-III-at kódoló kromoszómális ptr3-gén és/vagy az OmpT-proteázt kódoló kromoszómális ompT-gén vonatkozásában is deficiens.

A találmány egy következő megvalósítási módjában az *E. coli* törzs heterológ polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz. A szóban forgó törzs, előnyösen, rekombináns expressziós vektor alkalmazásával nukleinsavval van transzformálva, mely nukleinsav, előnyösen, DNS (cDNS vagy genomi DNS).

A találmány egy következő szempontja értelmében eljárást tárunk fel heterológ polipeptid előállítására, melynek során a találmány szerinti *E. coli* törzset (amely polipeptidet kódoló nukleinsavat is tartalmaz) a nukleinsav expresszióját elősegítő feltételek mellett tenyésztjük, majd a polipeptidet kinyerjük a törzsből. A kinyerés történhet a sejtek periplazmájából vagy a tenyésztő tápközeg-

ből. A tenyésztést előnyösen fermentorban, még előnyösebben nagy sejtsűrűségű fermentációs feltételek mellett végezzük.

A tenyésztési paramétereket szokványos módon alkalmazzuk, csakúgy, mint a polipeptid-termeltetést (például, az alábbiakban leírt eljárásokkal).

A) Nukleinsav kiválasztása és módosítása

A kívánt polipeptidet kódoló nukleinsav, alkalmas módon, tetszőleges forrásból származó RNS, cDNS vagy genomi DNS, feltéve, hogy a kívánt polipeptidet kódolja. A heterológ polipeptidek (ideértve azok változatait is) *E. coli* sejtekben történő expresszáltatására alkalmas nukleinsavak kiválasztására jól ismert eljárások állnak rendelkezésre.

Ha monoklonális antitestek termeltetése a cél, a monoklonális antitestet kódoló DNS - szokványos eljárások alkalmazásával - egyszerűen izolálható és szekvenálható (pl. az egérezetű antitestek nehéz, ill. könnyű láncát kódoló génekhez specifikusan hibridizáló oligonukleotid-próbák alkalmazásával). Az ilyen DNS előnyös forrásul hibridómasejtek szolgálnak. Izolálás után a DNS-t expressziós vektorokba inszertálhatjuk, és a vektorokkal bakteriális gazdasejteket transzformálhatunk, miáltal a rekombináns gazdasejtekben monoklonális antitestek termelődnek. Az antitestet kódoló DNS baktériumokban, rekombináns módszerekkel történő előállítását illetően ld.

pl. Skerra és mtsai.: Curr. Opinion in Immunol. 5, 256 (1993); Plöckthun: Immunol. Revs. 130, 151 (1992).

A nem humán antitestek humanizálási eljárásainak leírása az idevonatkozó szakirodalomban megtalálható. A humanizált antitest előnyösen egy vagy több, nem humán forrásból származó aminosavat tartalmaz. Ezeket a nem humán aminosavakat gyakran "import" aminosavaknak nevezzük, melyek rendszerint egy "import" variábilis doménből származnak. Az antitestek humanizálását lényegében Winter és mtsai. eljárásával hajtjuk végre [Jones és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Verhoyen és mtsai.: Science 239, 1534 (1988)], oly módon, hogy egy humán antitest megfelelő szekvenciáit hipervariábilis szekvenciákkal helyettesítjük. Ennek megfelelően, az ilyen "humanizált" antitestek kiméra antitestek (ld. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), amelyekben az antitest - teljes humán variábilis doménnél lényegesen kisebb - része van helyettesítve egy nem humán fajból származó, megfelelő szekvenciával. A gyakorlatban a humanizált antitestek rendszerint olyan humán antitestek, amelyekben a hipervariábilis régió néhány aminosava - és esetleg a vázrégió (FR) néhány aminosava - rágcsálóeredetű antitestek analóg pozícióiból származó aminosavakkal van helyettesítve.

Az antigenitás csökkentése szempontjából nagy jelentősége van a humanizált antitestek létrehozására alkalmazandó (nehéz és könnyű láncból származó) humán variábilis domének kiválasztásának. Az úgynevezett "legjobb egyezés" módszer

szerint egy rágcshálóeredetű antitest variábilis doménjének szekvenciáját ismert humán variábilis domének szekvenciáit tartalmazó teljes könyvtárral hasonlítjuk össze. A rágcshálóeredetű szekvenciával legközelebbi egyezést mutató humán szekvenciát a humanizált antitest humán vázának fogadjuk el [Sims és mtsai.: J. Immunol. 151, 2296 (1993); Chothia és mtsai.: J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)]. Egy másik módszer szerint az összes - egy bizonyos alcsoportba tartozó könnyű és nehéz láncot tartalmazó - humán antitest konszenzus-szekvenciájából származó vázrégiót alkalmazunk. Különböző humanizált antitestek esetében ugyanaz a vázrégió használható [Carter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992); Presta és mtsai.: J. Immunol. 151, 2623 (1993)].

Lényeges továbbá, hogy az antitestek a humanizálást követően is megtartsák az antigénre vonatkozó affinitásukat és egyéb kedvező biológiai tulajdonságaikat. Ennek érdekében, az egyik előnyös eljárás szerint, a humanizált antitesteket a kiindulási szekvenciák és a különböző lehetséges humanizált termékek - háromdimenziós modellek felhasználásával végzett - analizálását követően állítjuk elő. Az immunglobulinok háromdimenziós modelljei széles körben hozzáférhetők és szakember számára jól ismertek. Számítógépes programok állnak rendelkezésre a kiválasztott lehetséges immunglobulin-szekvenciák valószínű háromdimenziós konformációs struktúráinak illusztrálására és megjelenítésére. Az így megjelenített struktúrák tanulmányozása elősegíti az egyes aminosavaknak a lehetséges immunglobulin-szekvencia működésében betöltött szerepének vizsgálatát, azaz a lehet-

séges immunglobulin antigénhez kötődő képességét befolyásoló aminosavak vizsgálatát. Ezen a módon kiválaszthatók a vázrégió aminosavai, és a recipiens és import szekvenciákból úgy kombinálhatók, hogy a kívánt antitest-tulajdonságokat (pl. a célantigén(ek)re vonatkozó fokozott affinitás) kapjuk. A hipervariábilis régió aminosavai általában közvetlenül és jelentős mértékben játszanak szerepet az antigénkötés befolyásolásában.

A humanizált vagy affinitás-fejlesztett antitestek különböző alakjait tárjuk fel. Például, a humanizált antitest vagy affinitás-fejlesztett antitest olyan antitest-fragmens (pl. Fab-fragmens) lehet, amely, adott esetben, immunkonjugátum létrehozása érdekében, egy vagy több célbajuttató ágenssel van konjugálva. Más módon, a humanizált vagy affinitás-fejlesztett antitest intakt antitest, például, intakt IgG1-antitest lehet.

Az Fab'-SH fragmensek *E. coli*-ból közvetlenül kinyerhetők, és kémiai kapcsolással $F(ab')_2$ -fragmensekké alakíthatók [Carter és mtsai.: *Bio/Technology* 10, 163 (1992)]. Egy másik lehetőség szerint az $F(ab')_2$ -fragmensek közvetlenül rekombináns gazdasejt-tenyészetből izolálhatók. Az antitest-fragmensek előállításának egyéb technikai szakember számára jól ismertek. Más megvalósítási módokban a kiválasztott antitest egyláncú Fv-fragmens (scFv); ld. WO 93/16185 számú nemzetközi közzétételi irat; valamint 5 571 894 és 5 587 458 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás. Az antitest-fragmens lehet "lineáris antitest" is (ld. pl. 5 641 870 számú egyesült államokbeli szabadalmi

leírás). A lineáris antitest-fragmensek monospecifikusak vagy bispecifikusak lehetnek.

A bispecifikus antitestek legalább két különböző epitóp irányában mutatnak kötőspecifitást. A jellemző bispecifikus antitestek a Dkk-1-protein két különböző epitópjához kötődhetnek. A bispecifikus antitestek teljes hosszúságú antitestként vagy antitest-fragmensként (pl. $F(ab')_2$ bispecifikus antitestekként) állíthatók elő.

Egy másik megközelítési mód szerint az antitestek kívánt kötési specifitású variábilis doménjeit (antitest-antigén kombinálódási helyek) immunglobulin konstans domén szekvenciáihoz fuzionáljuk. A fúziót előnyösen egy immunglobulin nehéz lánc konstans doménjénél valósítjuk meg, amely legalább a csukló-, CH2- és CH3-régió részét tartalmazza. Előnyös, ha a konstans domén tartalmazza - a könnyű lánchoz történő kötődéshez szükséges helyet magában foglaló - első nehéz lánc konstans régiót (CH1). Az immunglobulin nehéz lánc fúziókat - és kívánt esetben az immunglobulin nehéz láncot - kódoló DNS-eket külön expressziós vektorokba inszertáljuk, és azokat együttesen megfelelő gazdaorganizmusba transzfektáljuk. Ez nagy rugalmasságot biztosít a három polipeptid relatív arányának beállításában, azon megvalósítási módokban, ahol az optimális hozam elérése érdekében a konstrukcióban a három különböző polipeptid-láncot nem azonos arányokban alkalmazzuk. Mindazonáltal, lehetőség van arra is, hogy két vagy mindhárom polipeptid-lánc kódolószekvenciáját egyazon expressziós vektorba inszertáljuk (olyan esetekben, ha legalább két polipeptid-

lánc azonos arányban történő expressziója eredményezi a nagy hozamot vagy ha a láncok relatív arányának nincs különösebb jelentősége).

E megoldás egy előnyös megvalósítási módja értelmében a bispecifikus antitestek - az egyik karon - hibrid immunoglobulin nehéz láncból (első kötő-specifitással) és - a másik karon - egy hibrid immunoglobulin nehéz lánc/könnyű lánc párból (második kötő-specifitással) állnak. Azt találtuk, hogy ez az aszimmetrikus struktúra elősegíti a kívánt bispecifikus vegyület nem kívánatos immunoglobulin-lánckombinációktól történő elválasztását, mivel az immunoglobulin könnyű láncnak a bispecifikus molekula csupán egyik felében való jelenléte egyszerű elkülönítést tesz lehetővé. E megoldás leírását illetően ld. a WO 94/04690 számú nemzetközi közzétételi iratot. A bispecifikus antitestek előállításának további részleteit ld. pl. Suresh és mtsai.: *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

Egy másik megoldás (ld. az 5 731 168 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) szerint a rekombináns sejtenyészetből kinyerhető heterodimerek százalékos arányának maximalizálása érdekében antitest-molekula pár közötti határfelület alakítható ki. Az előnyös határfelület egy antitest konstans doménje C_H3-doménjének legalább egy részét tartalmazza. Az eljárás során az első antitest-molekula határfelületéből egy vagy több kisméretű aminosav-oldalláncot nagyobb oldallánccal (pl. tirozin vagy triptofán) helyettesítünk. A második antitest-molekula határfelületén a nagy oldallán(ok)ével azonos vagy hasonló méretű kompenzáló

"Öregeket" hozhatunk létre, oly módon, hogy a nagyobb aminosav-oldalláncokat kisebbekre (pl. alaninra vagy treoninra) cseréljük. Ez a mechanizmus a heterodimer jobb hozamát biztosítja (a nem kívánatos végtermékekhez, úgymint a homodimerekhez viszonyítva).

A bispecifikus antitestek közé tartoznak a kereszt-kötéses vagy "heterokonjugált" antitestek is. Például, a heterokonjugátumban lévő egyik antitest avidinhez, a másik biotinhoz lehet kapcsolva. Az ilyen antitestek alkalmazását, például, az immunrendszer sejtjeinek nem kívánatos sejtek elleni célba juttatására (4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) és HIV-fertőzés kezelésére javasolták (WO 91/00360 és WO 92/200373 számú nemzetközi közzétételi irat és EP03089 számú európai szabadalmi leírás). A heterokonjugált antitestek bármely alkalmas kereszt-kötés-képző eljárással előállíthatók. Az ilyen célra megfelelő kereszt-kötés-képző ágensek jól ismertek (leírásukat - különféle kereszt-kötési technikákkal együtt - ld. a 4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást).

A bispecifikus antitestek antitest-fragmensekből történő előállításának technikái szintén jól ismertek. Például, bispecifikus antitestek előállíthatók kémiai kötés alkalmazásával. A Brennan és mtsai. [Science 229, 81 (1985)] által leírt eljárásban intakt antitestek proteolitikus emésztésével $F(ab')_2$ -fragmenseket hoztak létre, majd e fragmenseket - a vicinális ditiolok stabilizálása és a molekulák közötti diszulfid-kötés kialakulásának megakadályozása céljából - ditiol-komplexáló reagenssel, nátrium-

arzeníttel redukálják. Ezután a kapott Fab'-fragmenseket tio-nitrobenzoát (TNB) származékokká alakítják, majd az egyik Fab'-TNB-származékot merkapto-etilaminnal végzett redukcióval visszaalakítják Fab'-tiollá, és azt a másik Fab'-TNB-származék ekvimoláris mennyiségével elegyítve a bispecifikus antitestet kapják. Az így létrehozott bispecifikus antitestek enzimek szelektív immobilizálására szolgáló reagensként alkalmazhatók.

Ezen túlmenően, a Fab'-SH-fragmensek *E. coli* sejtekből közvetlenül kinyerhetők, és kémiai kapcsolással bispecifikus antitestekké alakíthatók [ld. Shalaby és mtsai.: *J. Exp. Med.* 175, 217 (1992)].

A bispecifikus antitest-fragmensek közvetlenül rekombináns sejttenyészetekből történő előállítási és izolálási technikáit szintén leírták. Például, bispecifikus antitesteket leucin-cipzár alkalmazásával állítottak elő [ld. Kostelny és mtsai.: *J. Immunol.* 148, 1547 (1992)]. A Fos- és Jun-proteinből származó leucin-cipzár peptideket génfüzió alkalmazásával két különböző antitest Fab'-részletéhez kapcsolják. Az antitest-homodimereket a csukló-régiónál redukálva monomereket hoznak létre, amelyeket visszaoxidálva az antitest-heterodimereket kapják. Ez a módszer antitest-homodimerek előállítására is felhasználható. A Hollinger és mtsai. [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444 (1993)] által leírt "diatest"-technika a bispecifikus antitestek létrehozásának egy alternatív mechanizmusát reprezentálja. A fragmensekben egy nehéz lánc variábilis domén (V_H) olyan kapcsolószekvencián keresztül kapcsolódik egy

könnyű lánc variábilis doménhez (V_L), amely túl rövid ahhoz, hogy az azonos láncban lévő két domén között következzen be párosodás. Ilyenformán, az egyik fragmens V_H - és V_L -doménjei arra vannak kényszerítve, hogy egy másik lánc komplementer V_H - és V_L -doménjeivel alkossanak párt, miáltal két antigénkötő hely jön létre. A bispecifikus antitestek előállításának egy másik - egyláncú Fv (sFv) dimerek alkalmazásán alapuló - módszerét Gruber és mtsai. [J. Immunol. 152, 5363 (1994)] írták le.

A több, mint két értékű antitestek szintén a találmány tárgyához tartoznak. Például, Tutt és mtsai. [J. Immunol. 147, 60 (1991)] trispecifikus antitestek előállítási eljárását írták le.

A polipeptid-változatokat kódoló nukleinsav-molekulák különféle, szakember számára jól ismert eljárásokkal állítható elő. Az ilyen módszerek közé tartozik, többek között, a természetes forrásból történő izolálás (természetben előforduló aminosav-szekvencia változatok esetében), valamint az antitest korábban előállított, variáns vagy nem variáns alakjának oligonukleotid-közvetítette (vagy helyspecifikus) mutagenézise, PCR-mutagenézise vagy kazetta-mutagenézise.

A találmány szerinti antitest effektor-funkciójának módosítására is szükség lehet (pl. Fc-receptor kötésének javítása érdekében). Ez úgy hajtható végre, hogy az antitest Fc-régiójába egy vagy több aminosav-módosítást iktatunk be. Más módon, vagy ezen túlmenően, az Fc-régióba egy vagy több ciszteint építhetünk be, ami lehetővé teszi, hogy e régióban láncok közötti diszulfidkötés alakuljon ki.

Az antitest vérsavóban mérhető felezési idejének növelése céljából az antitestbe (elsősorban antitest-fragmensbe) ún. "mentőreceptor-kötő epitópot" ("salvage receptor binding epitope") építhetünk be. Ahogy itt használjuk, a "mentőreceptor-kötő epitóp" kifejezésen egy IgG-molekula (pl. IgG₁, IgG₂, IgG₃ vagy IgG₄) Fc-régiójának epitópját értjük, amely az IgG-molekula in vivo felezési idejének növeléséért felelős.

A találmány szerinti megoldás értelmében egyéb antitest-módosítások is végrehajthatók. Például, az antitest különféle nem protein jellegű polimerhez (pl. polietilén-glikolhoz, polipropilénglikolhoz, polioxialkilénekhez vagy polietilénglikol és polipropilénglikol ko-polimereihez) kapcsolható.

B) Nukleinsav inszertálása replikációra képes vektorba

A heterológ nukleinsavat (pl. cDNS-t vagy genomi DNS-t) baktériumsejtekben történő expresszáltatása céljából (megfelelő promóter 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 kompatibilísek) különböző komponenseket tartalmaznak. A vektorok, többek között, a következő komponenseket tartalmazhatják: szignálszekvencia, replikációs kezdőhely, egy vagy több markergén, promóter és transzkrip-

ciós 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 [ld., pl. Bolivar és mtsai.: *Gene* 2, 95 (1977)]. A pBR322-plazmid ampicillin- és tetraciklin-rezisztencia gént tartalmaz, ezáltal egyszerű módját biztosítja a transzformált sejtek azonosításának. A pBR322-plazmid (más bakteriális plazmidhoz vagy fághoz hasonlóan) általában olyan promótereket tartalmaz, amelyek *E. coli* gazdasejtekben alkalmasak a szelektálható markergének expressziójának szabályozására.

(i) Szignálszekvencia komponens

A találmány szerinti polipeptidet kódoló DNS nemcsak közvetlenül, de más polipeptiddel (előnyösen szignálszekvenciával vagy egyéb, az érett protein vagy polipeptid N-terminálisán specifikus hasítási helyet tartalmazó polipeptiddel) képzett fúziós polipeptidként is előállítható. 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 felis-

merni és feldolgozni (azaz szignál-peptidázzal lehasítani).

Prokarióta gazdasejtek esetében a természetes antitest szignálszekvenciáját (mivel azt a prokarióta sejtek nem képesek felismerni és feldolgozni) prokarióta szignálszekvenciával helyettesítjük. Az alkalmas prokarióta szignálszekvenciák közé tartozik az alkalikus foszfataz, penicillináz, lpp vagy a hőstabil enterotoxin-II vezetőszekvenciája.

(ii) Replikációs kezdőhely komponens

Az expressziós vektorok tartalmaznak olyan nukleinsav-szekvenciát, 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 alkalmazható.

(iii) Szelekciós gén komponens

Az expressziós vektorok általában tartalmaznak szelekciós gént (más néven szelektálható markert) is. A jellemző szelekciós gének olyan proteineket kódolnak, amelyek (a) antibiotikumokkal vagy egyéb toxinokkal (pl. ampicillin, neomicin, methotrexát vagy tetraciklin) szembeni rezisztenciát biztosítanak; (b) auxotróf deficienciákat egészítenek ki; vagy (c) komplex tápközegekben nem található, kulcsfontosságú tápanyagokat biztosítanak (pl. *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 mtsai.: J. Molec. Appl. Genet. 1, 327 (1982)], a mikofenolsav [Mulligan és mtsai.: Science 209, 1422 (1980)] és a higromicin alkalmazása [Sugden és mtsai.: Mol. Cell. Biol. 5, 410 (1985)] említhető. E három esetben eukarióta szabályozás alatt bakteriális géneket alkalmaznak, melyek G418-cal vagy neomicinnel (geneticin), xgpt-vel (mikofenolsav), illetve higromicinnel szembeni rezisztenciát közvetítenek.

(iv) Promóter komponens

A kívánt polipeptid termeltetésére alkalmas expressziós vektor megfelelő promótert is tartalmaz, amelyet a gazdaorganizmus felismer, és amely az antitestet kódoló nukleinsavhoz működőképesen kapcsolódik. A prokarióta gazdasejtekben alkalmazható promóterek közé tartoznak a β -laktamáz és laktóz promóter-rendszerek [Chang és mtsai.: Nature 275, 615 (1978); Goeddel és mtsai.: Nature 281, 544 (1979); az arabinóz promóter-rendszer [Guzman és mtsai.: J. Bacteriol. 174, 7716 (1992); alkalikus foszfatáz, triptofán (trp) promóter-rendszer [Goeddel: Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980) és EP 36 776 számú európai szabadalmi leírás], valamint hibrid promóterek, mint például a tac-promóter [deBoer és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21 (1983)], azonban egyéb bakteriális promóterek is alkalmazhatók. Az ilyen promóterek nukleotidszekvenciája jól is-

mert, így szakember számára nem okoz gondot ezek kívánt polipeptidet kódoló DNS-hez történő ligálása, melynek során - a szükséges restrikciós felismerési helyek biztosítása érdekében - megfelelő kapcsolószekvenciák vagy adapterszekvenciák alkalmazhatók.

A bakteriális rendszerekben alkalmazható promóterek rendszerint - az adott polipeptidet kódoló DNS-hez működőképesen kapcsolva - Shine-Dalgarno (S.D.) szekvenciát is tartalmaznak. A promóter restrikciós enzimes 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 ellenőrzések céljából a ligálási eleggyel *E. coli* K12 294-es törzset (ATCC 31 446) vagy más törzseket transzformálunk, és a sikeres transzformánsokat - ha lehetséges - ampicillin- vagy tetraciklin-rezisztencia alapján szelektáljuk. A transzformánsokból plazmidokat állítunk elő, azokat restrikciós endonukleázos emésztéssel analizáljuk, és/vagy Sanger és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)] vagy Messing és mtsai. [Nucleic Acids Res. 9,

309 (1981)] vagy Maxam és mtai. [Methods in Enzymology 65,
499 (1980)] eljárásával szekvenáljuk.

C) Gazdasejtek szelektálása és transzformálása

Az expressziós plazmidok gazdasejtjeiként alkalmazható *E. coli* sejtek példaként említhető, többek között, az *E. coli* W3110-törzs (ATCC 27325), az *E. coli* 294-es törzs (ATCC 31446), az *E. coli* B-törzs és az *E. coli* X1776-törzs (ATCC 31537). Kiindulási gazdasejtként e törzsek mutáns alakjai is alkalmazhatók, melyeket azután további mutációknak vethetünk alá, hogy legalább a minimálisan szükséges genotípust tartalmazzák.

Az *E. coli* W3110-törzs előnyös szülői gazdatörzs, mivel széles körben alkalmazzák a rekombináns DNS-termékek fermentációs gazdatörzseként. A szülői gazdatörzsekként alkalmazható kiindulási *E. coli* törzsek példáit (genotípusuk feltüntetésével) az alábbi táblázatban soroljuk fel.

Törzs	Genotípus
W3110	K-12 F ⁻ lambda ⁻ IN(rrnD-rrnE)1
1A2	W3110 Δ fhuA
9E4	W3110 Δ fhuA ptr3
27A7	W3110 Δ fhuA ptr3 phoAAE15 Δ (argF-lac)169
27C6	W3110 Δ fhuA ptr3 phoAAE15 Δ (argF-lac)169 Δ ompT
27C7	W3110 Δ fhuA ptr3 phoAAE15 Δ (argF-lac)169 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan ^R)
33D3	W3110 Δ fhuA ptr3 lacIq lacL8 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan ^R)
36F8	W3110 Δ fhuA phoAAE15 Δ (argF-lac)169 ptr3 degP41 (Δ pstI-kan ^R) ilvG2096 ^R
43D3	W3110 Δ fhuA ptr3 phoAAE15 Δ (argF-lac)169 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan ^R) ilvG2096 ^R
43E7	W3110 Δ fhuA Δ (argF-lac)169 Δ ompT ptr3 phoAAE15 degP41 (Δ pstI-kan ^S) ilvG2096 ^R
44D6	W3110 Δ fhuA ptr3 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-kan ^S) Δ ompT ilvG2096 ^R
45F8	W3110 Δ fhuA ptr3 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-kan ^S) Δ ompT phoS* (T10Y) ilvG2096 ^R
45F9	W3110 Δ fhuA ptr3 Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-kan ^S) Δ ompT ilvG2096 ^R phoS* (T10Y) Δ cyo::kan ^R

Szintén alkalmasak a 36F8-törzs létrehozásának köztes-termékei, vagyis a 27B4 (ld. az 5 304 472 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) és a 35E7 (amely egy spon-

tán hőmérséklet-rezisztens kolónia-izolátum, 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 (1990. augusztus 7.) tártak fel.

A találmány szerinti törzsek a szülő törzs kromoszómális integrálásával vagy más technikák alkalmazásával hozhatók létre (ideértve a példákban leírt módszereket).

A polipeptidet kódoló nukleinsavat a gazdasejtekbe inszertáljuk. Ezt előnyösen a gazdasejtek fentebb leírt expressziós vektorokkal végzett transzformálásával, és a transzformánsok - különböző promóterek indukálásához megfelelően módosított - hagyományos tápközegben történő tenyésztésével hajtjuk végre.

A transzformáció során a DNS-t egy organizmusba juttatjuk be, oly módon, hogy a DNS - extrakromoszómális elemként vagy a gazdasejt kromoszómájába integrálódva - replikációra képes legyen. Az alkalmazott gazdasejttől függően a transzformációt standard technikák alkalmazásával hajtjuk végre. Prokarióta sejtek és más, jelentős sejtfal-gátaikat tartalmazó sejtek esetében általában a kalcium-kloridos kezelést alkalmazzuk [ld. Sambrook és mtsai. "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 [ld. Chung és Miller:

Nucleic Acids Res. 16, 3580 (1988)]. Egy további eljárás során elektroporációs technikát alkalmazhatunk.

D) Gazdasejtek tenyésztése

A kívánt polipeptid termeltetésére kiválasztott prokarióta sejteket megfelelő tápközegben, lényegében Sambrook és mtsai. (ld. fentebb) leírása szerint tenyésztjük. A tenyésztési feltételeket (pl. hőmérséklet, pH és hasonlók) az expresszióra kiválasztott gazdasejteknel korábban alkalmazottaknak megfelelően választjuk meg.

Alkalikus foszfátáz promóter alkalmazása esetén a tálmány szerinti polipeptid termeltetésére kiválasztott *E. coli* sejteket megfelelő tápközegben tenyésztjük, amely biztosítja az alkalikus foszfátáz promóter részleges vagy teljes indukcióját (ld. pl. Sambrook és mtsai. fentebb idézett művét). A tenyésztést soha nem szervesetlen foszfát hiányában vagy foszfáthiányos feltételek mellett végezzük. A tápközeg először a proteinszintézis indukálásához és a baktérium szaporodásához szükséges koncentrációnál nagyobb mennyiségű szervesetlen foszfátot tartalmaz. Ahogy a sejtek szaporodnak és felhasználják a foszfátot, a tápközegben csökkenni kezd a foszfátkoncentráció, ami a polipeptid szintézisének indukcióját eredményezi.

A szén-, nitrogén- és szervesetlen foszfát-forrás mellett az egyéb szükséges tápközeg-összetevők megfelelő koncentrációkban - önmagukban vagy egyéb összetevőkkel vagy tápközeggel alkotott elegyként (pl. komplex nitrogénforrás-

ként) - a tápközeghez adhatók. A tápközeg pH-ja, döntően az alkalmazott gazdaszervezettől függően, 5 és 9 közötti érték lehet.

Indukálható promóter alkalmazása esetén a sejteket, az indukció bekövetkezése érdekében, rendszerint egy adott optikai denzitás 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.

E) Az expresszió detektálása

Egy mintában a génexpressziót közvetlenül, például, hagyományos Southern-blot analízissel, az mRNS transzkripciójának mennyiségi meghatározását lehetővé tevő northern-blot analízissel [Thomas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201 (1980)], dot-blot analízissel (DNS-analízis) vagy - a polipeptid szekvenciáján 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, pl. radionuklidokkal, fluoreszcens jelölőkkel, enzimekkel és

hasonlókkel jelölhetők) kötőhelyeként szolgál. Más módon, a protein kimutatására megfelelő vizsgálati eljárások vagy gélek alkalmazhatók.

Az expresszált géntermék szekréciója érdekében a gazdaséjtet a géntermék szekréciójához megfelelő feltételek mellett tenyésztjük. Azok a megfelelő feltételek (pl. hőmérséklet, tápanyag-összetétel, sejtsűrűség), amelyek lehetővé teszik a sejt általi szekréciót, illetve, amelyek mellett a sejt képes az olyan alapvető celluláris funkciók végrehajtására, mint a transzkripció, transzláció és a proteinek egyik celluláris kompartmentből másikba történő szállítása.

F) Poliipeptidek tisztítása

A poliipeptidek tisztítására, az adott poliipeptid típusától függően, a következő tisztítási eljárások alkalmazhatók (önmagukban vagy egymással kombinálva): immunaффinitási vagy ioncserélő oszlopon végzett frakcionálás; etanolos precipitáció; reverz fázisú, nagyteljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC); hidrofób kölcsönhatási kromatográfia; szilikagél-kromatográfia; ioncserélő kromatográfia, pl. S-Sepharose[™] vagy DEAE-gyantán; kromatofókusztálás; SDS-PAGE; ammónium-szulfátos precipitáció; és gélfiltráció, például, Sephadex[™] G-75 alkalmazásával.

A monoklonális antitestek, alkalmas módon, szokványos antitest-tisztítási eljárások (például, protein-A-Sepharose kromatográfia, hidroxilapatit-kromatográfia, gélelektro-

forézis, dialízis vagy affinitási kromatográfia) alkalmazásával választhatók el a tenyésztő tápközegtől.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban kísérleti példákon keresztül szemléltetjük, melyek nem jelentik a találmány oltalmi körének korlátozását. A leírásban említett valamennyi irodalmi és szabadalmi hivatkozást teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintjük.

1. példa

Anyagok és módszerek

A) Expressziós plazmidok

1) rhuFab'-LZ (xCD18) fragmensek és toldalékkal

ellátott származékaik expresszáltatására alkalmas plazmidok

pS1130

A pS1130-plazmid egy pBR322-alapú plazmid (ld. a 6 180 367 és 6 258 560 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). Az rhuFab'-LZ (xCD18) szintézise az *E. coli* alkalikus foszfatáz (AP) promótere szabályozása alatt áll. Ha az AP-promótert foszfáthiány indukálja, dicisztronos mRNS-t alakít ki, a következő sorrendben: STII-szignál/kappa könnyű láncot kódoló szekvencia; STII-szignál/nehéz láncot kódoló szekvencia; leucin-cipzár szekvencia. A transzlációs terminációs kodon közelébe transzkripciós terminációs szignált helyeztünk.

pcyc34

A pcyc34-plazmid a pS1130-plazmid tacII-promótert tartalmazó párja.

pxCD18-7T3

Ez a két promóteres plazmid, amely két külön transzlatációs egységet tartalmaz, lehetővé teszi a könnyű lánc és a nehéz lánc transzkripciójának időbeli szétválasztását. A pxCD18-7T3-plazmidban a könnyű lánc - hasonlóan a pS1130-plazmidhoz, a phoA-promóter szabályozása alatt áll, azonban a könnyű lánc kódolószekvenciája után egy λ terminációs terminátor található. E terminációs szekvenciától 3'-irányban egy tacII-promótert helyeztünk el, amely a nehéz lánc fragmens/C-terminális leucin-cipzár szekvencia transzkripcióját szabályozza [DeBoer és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 21 (1983)]. Ezt a kódolószekvenciát egy második λ terminációs terminátor követi. A két lánc szekréciójának irányítására az STII szignálszekvencia néma kodonváltozatait alkalmaztuk [ld. Simmons és Yansura: Nature Biotechnology 14, 629 (1996)]. Az STII-szignálszekvencia nukleotidjait úgy módosítottuk, hogy a könnyű lánc relatív TIR-erőssége 7, a nehéz lánc relatív TIR-erőssége pedig 3 legyen, és a szignálszekvencia - könnyű, illetve nehéz lánc előtti utolsó három nukleotidja GCT legyen. E két promóteres rendszerben a phoA-promóterszekvencia és a könnyű és nehéz láncot kódoló DNS megegyezik a pS1130-plazmidban találhatóakkal.

pAB3

A pAB3-plazmidot az anti-CD18 F(ab')₂-fragmens *E. coli* periplazmájában - alkalikus foszfatáz promóter [Kikuchi és mtsai.: Nucleic Acids Res. 9(21), 5671 (1981)] szabályozása alatti - expresszáltatására terveztük. E plazmidban a könnyű

nyű és nehéz lánc előtt hőstabil enterotoxin-II szignálszekvencia [Picken és mtsai.: Infect. Immun. 42, 269 (1983)] helyezkedik el, és a nehéz lánc C-terminális végére élesztőeredetű GCN4 leucin-cipzár, azt követően pedig hat hisztidin van fuzionálva. A könnyű és nehéz lánc kódolószekvenciája a - nehéz lánc génje után lévő - λ t₀ transzkripciós terminátorral [Scholtissek és Grosse: Nucleic Acids Res. 15, 3185 (1987)] polycisztronos konfigurációban helyezkedik el.

A pAB3-plazmidot három DNS-fragmens egymáshoz ligálásával hoztuk létre. Az első DNS-fragmens a pS1130-vektor, amelyből egy rövid KpnI/SphI-fragmenst eltávolítottunk. A második DNS-fragmens a pS1130-vektor hozzávetőleg 645 bázispáros KpnI/HindIII-fragmense, míg a harmadik fragmens egy szintetikus DNS-dupez, amelynek nukleotidszekvenciája a következő:

5'-AGCTTGTCGGGGAGCGCCATCACCATCACCATCACTAAGCATG (6. azonosítószámú szekvencia);

ACAGCCCCCTCGCGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTC-5' (7. azonosítószámú szekvencia).

pAB21

Ez a plazmid a pAB3 származéka, amelyben a nehéz lánc C-terminális végén lévő hat hisztidin hat lizinnel van helyettesítve. A pAB21-plazmidot a pAB3-hoz hasonló módon állítottuk elő, azzal a különbséggel, hogy a ligáláshoz szintetikus DNS-ként a következő nukleotidszekvenciájú DNS-t alkalmaztuk:

5'-AGCTTGTCGGGGAGCGCAAAAAGAAAAAGAAAAAGTAAGCATG (8. azonosí-

tószámú szekvencia);

ACAGCCCCCTCGCGTTTTTCTTTTCTTTTTCATTC (9. azonosító-
számú szekvencia).

2) Szöveti faktor elleni Fab'2-LZ-6xHis antitest-fragmens
expresszáltatására alkalmas plazmid

A D3H44-F(ab')₂-plazmidot (más néven pD3h44f2), melyet a
szöveti faktor elleni Fab'2-(leucin-cipzár)-(6xHis) anti-
test-fragmens termeltetésének vezérlésére hoztunk létre,
ugyanolyan DNS-vázszekvenciát tartalmaz, mint a pAB3, azzal
a különbséggel, hogy a nehéz lánc, illetve könnyű lánc va-
riábilis régióit (VH, illetve VL) - az xCD18 variábilis ré-
giók helyett - xTF variábilis régiókra cseréltük. E plazmid
előállítását illetően ld. a WO 01/70984 számú nemzetközi
közzétételi iratot (2001. szeptember 27).

Közelebbről, először a szöveti faktor elleni (anti-TF)
Fab-fragmenst expresszáló plazmidot állítottuk elő, a kö-
vetkezők szerint: az F(ab)-fragmensek *E. coli* sejtekben
történő mutagenézisére és expresszáltatására alkalmazható
pEMX1-plazmidot Werther és mtsai. [J. Immunol. 157, 4986
(1996)] írták le. Ez a plazmid konszenzus humán κ I. alcso-
portba tartozó könnyű láncot (VL κ I-CL) és konszenzus humán
 κ III. alcsoportba tartozó nehéz láncot (VHIII-CH1) kódoló
DNS-fragmenst, illetve alkalikus foszfatáz promótert tar-
talmaz. A VL- és VH-láncok esetében a konszenzus szekvenci-
ák alkalmazását illetően ld. Carter és mtsai.:
Bio/Technology 10, 163 (1992); Carter és mtsai.: Proc.
Natl. Acad. Sci USA 89, 4285 (1992).

A pEMX1-plazmid dezoxiuridint tartalmazó templátján

helyspecifikus mutagenézist [Kunkel: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 438 (1985)] hajtottunk végre. A hat komplementaritást meghatározó régiót (CDR) egéreredetű D3-szekvenciára cseréltük; az egyes CDR-régiókba beépített aminosavakat a szekvencia-alapú CDR-definíciók [ld. Kabat és mtsai.: „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5. kiadás, Public Health Service (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))] alapján választottuk ki, kivéve a CDR-H1-et, amelyet a Kabat és mtsai. (ld. fentebb), illetve a Chothia és mtsai. [Nature 342, 877 (1989)] által leírt CDR-H1-definíciók kombinálásával határoztunk meg (ennek alapján a CDR-H1 a nehéz lánc H26-H35 szakaszát alkotja). Ennek megfelelően a D3H44-F(ab) olyan F(ab)-fragmenst kódol, amely egy teljes humán vázrégióból (VL κ I. alcsoport és VH III. alcsoport), valamint hat teljes egéreredetű CDR-szekvenciából áll.

A D3H44-F(ab')₂ létrehozása céljából a D3H44-F8ab) C-terminális végéhez nehéz lánc csukló („hinge”) régiót (CPPCPAPELLGG; 10. azonosítószámú szekvencia), illetve GCN4 leucin-cipzárt és (His)₆-toldalékot (a tisztítás elősegítése érdekében) kapcsolunk (a leucin-cipzárt és a (His)₆-toldalékot illetően ld. a pAB3-plazmíd fenti leírását).

3) VEGF elleni Fab-fragmensek expresszáltatására alkalmas plazmidok

pY0317

Az affinitás-fejlesztett Y0317-es anti-VEGF Fab-proteint Chen és mtsai. [J. Mol. Biol. 293, 865 (1999)] ír-

ták le. Az e protein előállítására alkalmazható plazmid (pY0317) létrehozása céljából az *E. coli* pBR322 plazmidváz EcoRI-helyére egy expressziós kazettát klónoztunk [Sutcliffe: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77 (1978)]. Az expressziós kazetta legalább a következő alapvető komponenseket tartalmazta: (1) *phoA*-promóter (a transzkripció vezérlésére); (2) λt_0 -terminátor (a transzkripció leállítására); és (3) *E. coli* *trp*-génből vagy hőstabil enterotoxin-II (STII) génből származó Shine-Dalgarno-szekvencia vagy kombinációjuk (a transzláció elősegítésére). A bakteriális expressziós plazmidok alapvető komponensei szakember számára jól ismertek, s leírásuk megtalálható az idevonatkozó szakirodalomban [a *phoA*-promótert illetően ld.: Kikuchi és mtsai.: Nucleic Acids Res. 9(21), 5671 (1981); a λt_0 -terminátort illetően ld.: Scholtissek és Grosse: Nucleic Acids Res. 15, 3185 (1987); a *trp*-t illetően ld.: Yanofsky és mtsai.: Nucleic Acids Res. 9, 6647 (1981); az STII-t illetően ld.: Picken és mtsai.: Infect. Immun. 42, 269 (1983); a *trp* és az STII Shine-Dalgarno-szekvenciáját illetően: Chang és mtsai.: Gene 55, 189 (1987)]. Ezen túlmenően, a pY0317-plazmidban a könnyű és nehéz láncot kódoló szekvenciák előtt - a protein periplazmába történő szekréciójának vezérlésére - STII-szignálszekvenciát (vagy annak néma kodonváltozatait) helyeztük el [ld. Picken és mtsai.: Infect. Immun. 42, 269 (1983); Simmons és Yansura: Nature Biotechnology 14, 629 (1996)]. A rekombináns protein termeltetése céljából a plazmid EcoRI-felismerési helyére inszertált 1952 bázispá-

ros expressziós kazetta nukleotidszekvenciáját, illetve az annak megfelelő aminosav-szekvenciát az 1. ábrán mutatjuk be (1., illetve 2. azonosítószámú szekvencia).

Az RhuFab V2 Y0317-et az egérreredetű A.4.6.1 monoklonális antitest [Presta és mtsai.: Cancer Res. 57, 4593 (1997)] - korábban más antitestekre leírt eljárás [ld. Carter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 4285 (1992); Presta és mtsai.: J. Immunol. 151, 2623 (1993); Werther és mtsai.: J. Immunol. 157, 4986 (1996)] alkalmazásával végzett - humanizálásával hoztuk létre. Röviden összefoglalva: az egérreredetű A.4.6.1 monoklonális antitest variábilis könnyű és nehéz láncait kódoló cDNS-eket - reverz transzkriptázos polimeráz láncreakció (RT-PCR) alkalmazásával - az egérreredetű monoklonális antitestet termelő hibridómasejtekből, izoláltuk. Ezeket a cDNS-eket klónoztuk és humán CL- és humán CH1-doménhez fuzionáltuk [ld. Werther és mtsai.: J. Immunol. 157, 4986 (1996)], miáltal egér-humán kiméra Fab-fragmenst kaptunk. A hat komplementaritást meghatározó régiót (CDR-régiók, melyeket az 1. ábrán félkövér betűtípussal szedve jelölünk) korábban humanizált antitest-vektorba ültettük át, mely vektor konszenzus humán κ I. alcsoportú könnyű láncot és konszenzus humán III. alcsoportú nehéz láncot tartalmazott [Carter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 4285 (1992)]. A humán antitest-vázba csak a komplementaritást meghatározó régiókat átültetve a VEGF-antigénre irányuló kötődés 1000-szeres csökkenését idéztük elő. A célmolekulához történő kötődés javítása érdekében a komplementaritást meghatározó régiók

közelében több vázalkotó aminosavat is lecseréltünk (az 1. ábrán dőlt betűkkel és aláhúzással jelölve) [Presta és mtsai.: *Cancer Res.* 57, 4593 (1997)]. A komplementaritást meghatározó régiókon kívül összesen hét nehéz láncba tartozó aminosavat és egy könnyű láncba tartozó aminosavat módosítottunk. A nehéz és könnyű láncokat kódoló szekvenciákat - a pHGHam-g3-plazmid [Bass és mtsai.: *Proteins* 8, 309 (1990)] hGH-génjének helyettesítésével - fág-„display” vektorba [Baca és mtsai.: *J. Biol. Chem.* 272, 10678 (1997)] inszertáltuk. A VL-láncban a (metionin-oxidáció lehetőségét kiküszöbölő) Met4Leu szubsztitúció, illetve a VH-láncban (a génIII-fúzióhoz történő klónozást elősegítő) Thr23Ileu szubsztitúció végrehajtására mutagenézist alkalmaztunk. Ezt a vektort Y0101-nek neveztük el, és a komplementaritást meghatározó régiók VEGF-antigénhez történő kötődése optimalizálásának kiindulási pontjaként alkalmaztuk [Muller és mtsai.: *Structure* 6, 1153 (1998)]. Csak a H1- és H3-CDR-regióban végrehajtott mutációkról bizonyosodott be, hogy javítják az antigénhez történő kötődést, így a pY0317-plazmid végső változatában ezeket alkalmaztuk. A pY0317-plazmidban - a pY0101-plazmidhoz képest - a következő szubsztitúciók találhatók: Thr28Asp, Asn31His, His101Tyr, Ser105Thr. E módosítások mindegyike a nehéz lánc variábilis régiójában található. A pY0317-plazmid egy Fab fág-„display” vektor, amelynek plazmid-diagramját a 2/A ábrán mutatjuk be.

pY0317tet20

A pY0317tet20-plazmidot az rhuFab V-2 *E. coli* sejtekben történő közvetlen termeltetése céljából hoztuk létre. A 2/A és 2/B ábrán a plazmid - pY0317-plazmidból kiinduló - előállításának folyamatábráját mutatjuk be. A pY0317tet20-plazmid a jól ismert pBR322-plazmid módosított változata. A plazmid pBR322-részből eltávolítottuk a 639 bázispáros *AvaI*/*PvuII*-fragmenst, ami a kópiaszám-szabályozásban szerepet játszó *rop*-gén [Cesareni és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6313 (1982)] eltávolítását eredményezte; következésképpen, ez a plazmid - a pBR322-höz képest - némileg fokozott kópiaszámú. A rekombináns protein termeltetése céljából a plazmid *EcoRI*-felismerési helyére 1952 bázispáros expressziós kazettát (1. ábra) inszertáltunk. A pY0317tet20-plazmid tetraciklinnel és β -laktám antibiotikumokkal szemben egyaránt rezisztenciát biztosít. Az expressziós kazetta a könnyű láncot, illetve a nehéz láncot kódoló gén egy-egy kópiáját (tandem elhelyezkedésben) tartalmazza. A két gén egyetlen dicisztronos mRNS-sé történő átírását az *E. coli* *phoA*-promóter vezérli [Chang és mtsai.: *Gene* **44**, 121 (1986)]. A két lánc transzlációs kezdőjelét *E. coli* STII (hőstabil enterotoxin) génjének Shine-Dalgarno-szekvenciája biztosítja. Az egyes láncok transzlációja 23 aminosavas STII-szignálpeptiddel [Picken és mtsai.: *Infection and Immunity* **42**, 269 (1983)] kezdődik, amely a peptidok periplazmikus térbe (citoplazma-membránon keresztül) történő áthelyeződését irányítja. Az STII-szignálpeptid az *E. coli* vezetőszekvencia-peptidázával ha-

sítható le. A periplazmába történő kiválasztást követően a könnyű és nehéz lánc - az összehajtogatódás („folding”) révén - felveszi natív konformációját, majd intermolekuláris diszulfid-kötésekkel kovalensen összekapcsolódnak.

A vektor végső változatába a pY0317-plazmid módosításával építettük be a tetraciklin-rezisztenciát (ld. 2/A és 2/B ábra). A p6G4V11N35A.PEG 2738 bázispáros SapI/ApaI-fragmenséhez (amely a nehéz lánc CH1-régióját kódoló szekvenciát és a pBR322-plazmidból származó tetraciklin-rezisztencia gént, illetve a nehéz lánc C-terminálisán - a protein helyspecifikus módosítását lehetővé tevő - négy extra aminosavat kódoló szekvenciát tartalmaz) a pY0317-plazmid 3642 bázispáros SapI/ApaI-fragmensét ligáltuk, mely utóbbi fragmens a pBR322-plazmid replikációs kezdőhelyét, β -laktamáz-gént, phoA-promótert, a teljes könnyű láncot kódoló szekvenciát és a nehéz lánc N-terminális felét kódoló szekvenciát tartalmazza. A négy extra aminosavat és a CH1-régiót tartalmazó régiót BssHII/HpaI-emésztéssel eltávolítottuk, és a pY0317 BssHII/XbaI-fragmensével helyettesítettük, helyreállítva ezáltal az eredeti nehéz lánc szekvenciát és deletálva a helyspecifikus modifikációs régiót. Először az XbaI-endonukleázos emésztést hajtottuk végre, majd a túlnyúló véget Klenow-fragmens és dezoxinukleotidok alkalmazásával feltöltöttük. Ezt követte a BssHII-endonukleázos emésztés és a 433 bázispáros fragmens gélelektroforézises tisztítása. A plazmid utolsó módosításaként a pBR322-plazmid NheI/NdeI-fragmensét a pBR322 - 639 bázispáros AvaI/PvuII-deléciót tartalmazó - NheI/NdeI-

fragmensével helyettesítettük. A végtermékként kapott pY0317tet20-plazmid *phoA*-promótert és anti-VEGF antitest könnyű és nehéz láncát kódoló géneket tartalmazó, és rezisztenciát nyújt a tetraciklinnel és a β -laktám antibiotikumokkal szemben.

4) Apo2L expresszáltatására alkalmas plazmid

A pAPApo2-P2RU-plazmidot a WO 01/00832 számú nemzetközi közzétételi iratban tárták fel. Ez a plazmid (amelynek összeállítását a 3. ábrán szemléltetjük) az Apo-2L (114-281. aminosavak) és a *pro2*-, illetve *argU*-gén által kódolt tRNS-ek együttes expresszióját biztosítja, melyet alkalikus foszfátáz promóter szabályoz. A pBR322-plazmidon [ld. Sutcliffe: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77 (1978)] alapuló pAPApo2-P2RU-plazmidot az Apo-2L *E. coli*-ban történő termeltetésére alkalmaztuk. Az Apo-2L expresszáltatásához szükséges transzkripciós és transzlációs szabályozószekvenciák a következők: alkalikus foszfátáz promóter és a *trp*-gén Shine-Dalgarno-szekvenciája, melyet a *phGH1*-plazmidban írtak le [Chang és mtsai.: Gene 55, 189 (1987)]. Az Apo-2L (114-281. aminosavak) kódolószekvenciája a promótertől és a Shine-Dalgarno-szekvenciától 3'-irányban helyezkedik el, és a kódolószekvencia előtt kezdő metioninkodon áll. A kódolószekvencia az Apo-2L 114-281. aminosavait kódoló nukleotidokat tartalmazza (ld. 4. ábra; 3. azonosítószámú nukleotidszekvencia, illetve 4. azonosítószámú aminosav-szekvencia), azzal a különbséggel, hogy a 119. prolin kodonját - a potenciális másodlagos szerkezet kikü-

szöbölése érdekében - „CCT”-ról „CCG”-re módosítottuk. A plazmidban λt_0 transzkripciós terminációs szekvencia [Scholtissek és mtsai.: Nucleic Acids Res. 15, 3185 (1987)] az Apo-2L kódolószekvenciája után helyezkedik el. A pAPAp2-P2RU-plazmid a pro2-gén [Komine és mtsai.: J. Mol. Biol. 212, 579 (1990)], illetve az argU/dnaY-gén [Garcia és mtsai.: Cell 45, 453 (1986)] tRNS-einek expresszáltatásához szükséges szekvenciákat is tartalmaz. Ezeket a géneket *E. coli* W3110-törzsből polimeráz láncreakcióval klónoztuk, és a λt_0 transzkripciós terminációs szekvenciától 3'-irányban helyeztük el. Ez a plazmid a termeltetésre alkalmazott gazdasajt számára tetraciklinnel és ampicillinnel szembeni rezisztenciát biztosít.

B) Sejtek transzformálása

A megfelelő törzs kompetens sejtjeit standard eljárások alkalmazásával, megfelelő plazmiddal transzformáltuk, és a sikeres transzformánsokat szelektáltuk és tenyésztetben szaporítottuk. A tetraciklin-rezisztenciát biztosító plazmidokkal transzformált sejtek esetében a transzformánsokat 20 $\mu\text{g/mL}$ tetraciklint tartalmazó LB-lemezeken (LB+Tet20) tenyésztettük, szélesztéssel tisztítottuk, majd 30 °C-os inkubátorban, rázatás közben 20 $\mu\text{g/mL}$ tetraciklint tartalmazó LB-táptalantban szaporítottuk, végül -80 °C-on DMSO-ban tároltuk.

A pxCd18-7T3- és pcy34-plazmid esetében, e plazmidokkal egy további plazmidot (pMS421) expresszáltattunk együtt. A pMS421-plazmid egy pSC101-alapú plazmid,

amely túlzott mértékben expresszálja a lacI_g-szuppresszort (amely a tacII-promóter indukcióját szuppresszálja, mindaddig, míg IPTG-t nem adunk hozzá), továbbá sztreptomycin- és spektinomycin-rezisztenciát biztosít. Ez a plazmid a kromoszómális lacI_g-gén további kópiáit biztosítja (lacI_g-törzsből származó saját promótere szabályozása alatt), mely gén a kompatibilis pSC101-plazmidban van elhelyezve.

C) Antitestek kivonása

Az *E. coli* oldható frakciójának elkészítéséhez 20 OD-mL sejttöledéket 500 μ L TRIS-HCl pufferben (pH = 8,0), 20 μ L EDTA-val (pH = 8,0) és 10 μ L lizozimmal (6 mg/mL) együtt szuszpendáltunk, majd az elegyet vortexeztük, 7-10 impulzussal ultrahangoztuk, végül 15 000-es percenkénti fordulatszámmal 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. A felülúszó frakciót nagy sótartalmú extraktumnak (HSE) nevezzük. A visszamaradt üledéket az oldhatatlan frakció analíziséhez használtuk fel.

D) Protein azonosítása

Az egydimenziós SDS-PAGE gélelektroforézist a Novex-től vásárolt 4-12 %-os lineáris akrilamid-gradienssel végeztük. A gélelektroforézishez a NOVEX® NuPage™ rendszert alkalmaztuk, amely NuPage Bis-TRIS Pre-Cast gélekből áll (kis és közepes molekulatömegű proteinekhez).

A kétdimenziós gélelektroforézist Champion és mtsai. [Electrophoresis 20(4-5), 994 (1999)] leírása szerint, az egyik irányban immobilizált pH-gradiens (pH = 3-10), a má-

sik irányban lineáris akrilamid-gradiens (9-18 %T) alkalmazásával (Amersham Pharmacia Biotech.) hajtottuk végre. A protein azonosítását ezüst/Coomassie-kék festés, N-terminális szekvenálás és tömegspektrometriai analízis kombinálásával végeztük. Az analitikai gélek elkészítéséhez *E. coli* sejtemésztményeket (kb. 40 µg protein) Champion és mtsai. leírása szerint (ld. fentebb) rehidratációs oldattal elegyítettük. Az izoelektromos fókuszáláshoz (összesen 50 000 Vh) 18 cm-es (pH = 3-10) nem lineáris immobilizált pH-gradiens (IPG) gélcsíkokat alkalmaztunk.

A preparatív módon feltöltött géleket polivinilidén-difluorid (PVDF) membránokra blottoltuk (ProBlott; Applied Biosystems; a gyártó útmutatásai szerint). Az N-terminális szekvenálást 20 perces Edman-cíklussal, PVDF-elektroblottolt proteinek szekvencia-analízisére alkalmas, több mintás, horizontális áramlású reaktor alkalmazásával végeztük [ld. Henzel és mtsai.: *Analytical Biochemistry* 267, 148 (1999)]. A könnyű láncra specifikus foltok molekulatömegét MALDI-TOF tömegspektrometria és a gélekről eluált minták kapilláris LC-MS analízisének alkalmazásával határoztuk meg (Champion és mtsai., ld. fentebb).

E) Célproteinek mérése

Az anti-CD18 F(ab')₂-LZ titer meghatározására az AME5™ reverz fázisú, dupla oszlopos vizsgálati eljárást alkalmaztuk (ld. lentebb).

F) AME5™ reverz fázisú, dupla oszlopos vizsgálati eljárás

1) Berendezés és felszerelések

Dupla oszlopos gradiens konfigurációban felállítottunk egy INTEGRAL™ munkaállomást (PerSeptive Biosystems). A célprotein befogására - szabályozott pórusméretű üvegen (CPG) immobilizált anti-könnyű lánc (κ) Fab-antitestet tartalmazó - affinitási oszlopot alkalmaztunk. A befogott antitest-fajták további felbontására 60 °C-ra beszabályozott hőmérsékletű, reverz fázisú oszlopot alkalmaztunk. Aktivált aldehid immunaffinitási gyantát (AL-20), reverz fázisú POROS-gyantákat (R220) és oszlopba töltő eszközöket a PerSeptive Biosystems-től (Cambridge, MA, USA) vásároltunk. 30 x 2,1 mm-es (110 µL térfogatú) CPG Empty PEEK oszlopokat az Upchurch Scientific-től (Oak Harbor, WA, USA) szereztünk be. Az *E. coli* mintákat 5 µm-es ACRODISC™ PF fecskendőfilterek (Gelman Sciences) alkalmazásával szűrtük.

2) AME5™ anti-humán kappa FAB (his-gly)₄-his-(lys)₃ tisztítása

Feltöltőpufferként - 9,4 mM nátrium-foszfátot, 136,9 mM nátrium-kloridot és 2,7 mM kálium-kloridot tartalmazó - foszfátpufferelt sóoldatot (pH = 7,2) alkalmaztunk. Monoklonális antitesteket egy egéreredetű Fab-fragmensből, az AME5™ anti-humán kappa FAB (his-gly)₄-his-(lys)₃-ból nyertünk, amelyet *E. coli* sejtpasztából tisztítottunk, és amelyet a találmány céljaira AME5™ Fab hgc-nek nevezünk el. Az *E. coli* sejtpasztát 27C7-sejtek 10 literes fermentumából készítettük. A sejteket 20 mM nátrium-foszfát, 0,25 M nátrium-klorid, 10 mM magnézium-klorid és 2 mM imidazol

összetételű oldatban ($\text{pH} = 7,0$) szuszpendáltuk, majd mikrofluidizáló készülék alkalmazásával homogenizáltuk. Az *E. coli* extraktumot 0,2 % polietilénimin (PEI) hozzáadásával és centrifugálással derítettük, majd a derített extraktumot ioncserélő kromatográfia és immobilizált fémionkelátképző (IMAC) kromatográfia kombinálásával tisztítottuk. A kelátképző Sepharose Fast Flow™ és SP Sepharose Fast Flow™ gyantákat az Amersham Pharmacia-tól szereztük be.

3) Az AME™ Fab hgk-antitest immobilizálása aktivált, glicerinnel bevont CPG-n

A tisztított Fab-antitestet perjodáttal aktivált, glicerinnel bevont, szabályozott pórusméretű üvegen (CPG) immobilizálva affinitási gyantát készítettünk. Az AME™ Fab hgk-antitestet Roy és mtsai. [J. Chromatography 303, 225 (1984)] eljárásának módosított változatának alkalmazásával immobilizáltuk az aktivált, glicerinnel bevont CPG-n.

A száraz CPG-t tisztított vízzel benedvesítettük, kromatográfiás oszlopba töltöttük, és az oszlopon 1 %-os nátrium-metaperjodátot (Sigma S-1878™) cirkuláltatva 30 percig aktiváltuk. Az aktivált gyantát ezután 20 mM nátrium-foszfát és 0,15 M nátrium-klorid összetételű kapcsolópufferbe ($\text{pH} = 7,2$) mostuk.

Az aktivált gyantaágyon az AME™ Fab hgk-antitest - 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nátrium-ciano-bórhidrid redukálószerrel (Sigma S8628) tartalmazó - kapcsolópufferben készített, körülbelül 5 mg/mL koncentrációjú oldatát cirkuláltattuk. Az antitest gyantához történő kapcsolódását a 280 nm-nél mért abszorp-

ció csökkenése alapján ellenőriztük. Amikor az abszorpció csökkenése megszűnt, a maradék antitestet kapcsolópufferrel lemostuk és kinyertük. A kapcsolási sűrűséget a kiindulási anyag mennyisége és a reakció befejeződése után kinyert mennyiség közötti különbség alapján határoztuk meg, és mg Fab/mL gyanta egységben adtuk meg.

A gyantán a maradék aktív helyeket 1M etanolamin, pH = 8,0 (ICN, katalógusszám: 151078) két óra hosszat végzett átfolytatásával (1 µg/mL nátrium-ciano-bórhidrid jelenlétében) reagáltattuk. A gyantát ezután - tárolás céljára - 0,01 % thimerosalt (GDL International) tartalmazó kapcsolópufferbe mostuk. A gyantát a kiegyensúlyozó és eluálópufferek alkalmazása között, bármiféle protein felvittele előtt, háromszor átcirkuláltattuk.

4) Reagensek és vizsgálati eljárás

A következő oldószereket alkalmaztuk: 1A oldószer, affinitási feltöltőpuffer; 1B oldószer, reverz fázisú vizes puffer és affinitási eluálópuffer: 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó víz; 2B oldószer, reverz fázisú szerves eluálópuffer: 0,09 % TFA/80 % acetonitril. 50 µL *E. coli* HSE-t (nagy sótartalmú extraktum, 1:2 hígításban) vagy a fermentációs tápleves felülúszójának 50 µL-ét (feltöltőpufferben) az oszlopra fecskendeztük. Az AME5™-antitest a fermentációs sejtextraktumokban található valamennyi anti-CD18 alakot megkötötte, amit az üres futtatás, a termeltetés utáni futtatás, illetve a termeltetés utáni futtatásból származó, affinitási oszlopon (AME5™-antitesttel) befogott anyag kétdimenziós géljeinek összeha-

sonlításával határoztuk meg. A nem specifikus adszorpció foszfátpufferelt sóoldatos mosással végzett lecsökkentése után az affinitási oszlopot reverz fázisú oszloppal sorba kapcsoltuk, és a befogott komponenseket híg savval végzett elúcióval átmostuk a reverz fázisú oszlopra, majd e komponenseket a reverz fázisú oszlop alacsony acetonitril-gradienssel végzett elúciójával frakcionáltuk. A detektálást a 280 nm-nél mért abszorbanancia alapján hajtottuk végre, és az intakt antitest mennyiségi meghatározását hasonlóan kezelt standardok csúcs alatti területeivel végzett összehasonlítással végeztük.

G) A kromatogram csúcsainak azonosítása

Ezzel a vizsgálattal az anti-CD18 fragmenseket öt antitestszerű csúcsra bontottuk fel, melyek a következő antitest-fragmenseket reprezentálják:

1. csúcs: LC-115 (a kappa könnyű lánc 115 aminosavas bomlásterméke);
2. csúcs: szabad könnyű lánc és glutationált könnyű lánc;
3. csúcs: könnyű lánc dimer;
4. Fab-szerű fragmens;
5. Fab'2-L2 vagy Fab'2-fragmens.

Standardként a tisztított anti-CD18 F(ab)'2 felszabadított anyagot (5 mg/mL) alkalmaztuk. A 49A5/pS1130 nagy sejtsűrűségű fermentációjából származó *E. coli* extraktumot -70 °C-on lefagyasztottuk, és ezt használtuk pozitív kontrollként. Valamennyi összehasonlításra kerülő minta esetében azonos sejtmennyiséget alkalmaztunk.

H) Teljes HC/LC POROS™ reverz fázisú vizsgálati eljárás

A fermentációval előállított könnyű lánc és nehéz lánc fragmensek összes mennyiségének meghatározására alternatív reverz fázisú HPLC-eljárást (RF-HPLC) alkalmaztunk. Az összes antitest-expresszió meghatározása céljából a teljes tápleves 100 μ L-ét 100 μ L 0,2 M Tris-pufferhez (pH = 8,0) adtuk. 10 impulzussal végzett ultrahangkezelést követően az elegyhez 650 μ L guanidin-HCl/50 mM Tris-puffert (pH = 9) és 50 μ L 2 M DTT-t adtunk, és ezt az elegyet szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. Az oszlopra történő feltöltést megelőzően 250 μ L acetonitrilt méretszelekciós centrifugaoszlopon (Pharmacia) leszűrtünk, és a POROS™ reverz fázisú eljárással a szuszpenzió 5 μ L-ét analizáltuk.

A reverz fázisú analízishez Perseptive POROS™ R-1 reverz fázisú oszlopot és Hewlett-Packard™ 1100 HPLC-t alkalmaztunk. A vizsgálathoz az oszlopot 60 °C-ra melegítettük, és 278 nm-nél monitoroztuk az UV-abszorbanciát. Az oszlopot - 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó - 28 %-os vizes acetonitril-oldattal ekvilibráltuk, majd a minta 25 μ L-ét az oszlopra töltöttük és 20 percig 18 % $\rightarrow$ 28 % acetonitril-gradienssel eluáltuk, majd az oszlopot 95 % acetonitrillel 17 percig regeneráltuk, végül 28 % acetonitrillel újraekvilibráltuk. A könnyű lánc- és nehéz lánc-eredetű fragmenseknek megfelelő csúcsokat standardokkal végzett összehasonlítással, illetve - ellenőrzés céljából - Hewlett-Packard™ tömegszelekciós detektorral végzett analízissel azonosítottuk. Hasonló módon készítettünk és analizáltunk „üres” fermentációból (melynek során ugyanazon

- de nehéz és könnyű lánc szekvenciák nélküli plazmidot hordozó - gazdasejtet alkalmaztunk) származó mintákat is, hogy az analízisekhez meghatározzuk a megfelelő alapszinteket. A csőcs alatt területek integrálását Hewlett-Packard™ 1100 szoftver alkalmazásával végeztük, és az üres fermentációból származó mintákba standardokat beiktatva kalibrációs görbét készítettünk, hogy meghatározzuk a mintákban lévő különböző antitest-fajták relatív mennyiségét.

Az oldható minták esetében a lizátumokat az ioncserélő vizsgálati eljárásnál leírtak szerint készítettük. Rendszerint a minta 100 µL-ét 650 µL 6M guanidin-HCl/50 mM Tris-HCl pufferrel (pH = 9) hígítottuk. A kapott elegyhez 50 µL frissen felolvasztott 2M ditiotreitolt, majd 200 µL acetonitrilt adtunk, végül a HPLC-oszlopra történő feltöltés előtt 0,2 µm-es filteren leszűrtük.

Az oldhatatlan lizátum mintákat szintén hasonló módon analizáltuk: a sejteztrakciót követően kapott - foszfátpufferelt sóoldattal átöblített - oldhatatlan üledéket 100 µL 0,2 M Tris-pufferben (pH = 8,0) újraszuszpendáltuk és jól összekevertük, majd 650 µL 6M guanidin-HCl/50 mM Tris-HCl puffert (pH = 9), 50 µL 2M ditiotreitolt (DTT), majd 200 µL acetonitrilt adtunk. A mintákat ezután leszűrtük, és a leszűrt minták 10 µL-ét az oldható lizátum mintáknál leírt módszerrel analizáltuk.

1) CSX vizsgálati eljárás

Az anti-CD19 Fab'-LZ antitest emésztményét HPLC kationcserélő kromatográfiával analizáltuk. A mintákat le-

galább 1:1 arányban hígítottuk, és a hígított minták 250 μ L-ét 50 x 4,6 mm-es BAKERBONDJTM karboxi-szulfon (CsX) oszlopra (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) vittük fel, melyet 55 °C-on inkubálva Hewlett-Packard 1090 HPLC-rendszerben analizáltunk. A mintákat hozzávetőleg 5 mM $\rightarrow$ 50 mM nátrium-foszfát (pH = 7,0) gradienssel 14 percig eluáltuk, majd a csúcsokat 278 nm-nél mért UV-abszorbancia alapján ellenőriztük. Az anti-CD18 Fab'2-LZ antitestet tartalmazó csúcs azonosítását és mennyiségi meghatározását tisztított standardokkal végzett összehasonlítással hajtottuk végre.

J) Sejtvonal-konstrukciók

Az rhuFab'2-LZ (xCD18) fermentációhoz gazdas sejtként az *E. coli* W3110-törzs [Bachmann: Cellular and Molecular Biology 2, 1190 (1987)] származékait alkalmaztuk, melyek a következők: 49A5, 58B3, 59A7, 43H1, 58H2, 45F8, 41H1 és 33D3. Az 5. ábrán bemutatjuk az *E. coli* 59A7-, 49A5- és 43H1-törzs származási vonalát.

1) 49A5-törzs

A 49A5-törzs komplett genotípusa a következő: Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 deoC2 degP41(Δ pst1-Kan^r) IN(rrD-rrE)1 ilvG2096 (Val^r) AfucP Δ malE. A kiindulási törzs, az *E. coli* W3110, az *E. coli* K-12-törzs származéka, mely utóbbi F'- és lambda-negatív, továbbá bebizonyosodott, hogy az rrnD- és rrnE-gén között kromoszóma-inverziót tartalmaz [Bachmann, ld. fentebb; Hill és Harnish: Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 7069 (1981)]. Az fhuA-gént (korábban tonA) a Tn10 - fhuA-génbe történő inszerciója utáni - pontatlan ki-

vágásával deletáltuk a W3110-törzsből. Az így kapott törzs, az 1A2, rezisztens a T1, T5 és Ø80 bakteriofágra.

A két deléciós mutációt, a *phoA* ΔE15-öt [Sarthý és mtsai.: J. Bacteriol. 145, 288 (1981)] és a Δ(*arg-lac*)169-et [Schweizer és mtsai.: Mol. Gen. Genet. 192, 293 (1983)] egyidejűleg - a *proC*-génben egy kapcsolt Tn5-inszercióval együtt - Pl ko-transzdukcióval egyszerre juttattuk be az 1A2-törzsbe. A transzpozon pontos kivágása a *proC*-gén helyreállítását eredményezte. A *phoA* ΔE15 mutáció megszünteti az alkalikus foszfátáz expresszióját, míg a Δ(*arg-lac*)169 mutáció e törzs (melyet 7C1-nek neveztünk el) *lac*⁻ fenotípusáért felelős.

A *deoC2*-mutációt (amely megszüntette a dezoxiribóz foszfát aldoláz expresszióját) Pl ko-transzdukcióval juttattuk be. A *deoC*-lokusz genetikailag kapcsolt a treonin bioszintetikus lokuszával. Tn10-inszercióval és pontatlan kivágással treonin-auxotróf mutánst hoztunk létre, amelyet *deoC2*-mutánszon növesztett Pl-fággal treonin prototrópiára transzdukáltunk. A *deoC2*-mutáció jelenlétét azzal bizonyítottuk, hogy a létrehozott törzs (16C9) nem volt képes növekedni a szénforrásként 0,2 % timidint tartalmazó tápközegen.

A *degP41*(Δ*Pst*1-Kan^r)-mutációt (amely a periplazmikus proteáz génjének mutációja) transzdukcióval juttattuk be a sejtekben. Ezt a mutációt *in vitro*, a *degP*-gén egyik szakaszának kanamicin-rezisztencia génnel [Strauch és Beckwith: J. Bacteriol. 171, 2689 (1989)] történő helyettesítésével hoztuk létre. Ez nem transzpozon, de a kanamicin-

rezisztencia alapján lehetővé teszi a deléció szelektálását. Az így kapott törzset 23E3-nak neveztük el.

Az *ilvG2096* (Val^r) mutációt [Lawther és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 922 (1981)] homogenizálással juttattuk be a sejtekbe. Ez a mutáció azt a fáziseltolódást („frameshift”) javítja ki, amely a vad típusú *E. coli* K-12-törzset érzékennyé teszi a valinra. A 23E3-törzset a pAH29-plazmiddal (Lawther és mtsai., ld. fentebb) transzformáltuk, mely plazmid *ilvG2096* (Val^r) markert és ampicillin-rezisztencia gént tartalmaz. Az ampicillin-rezisztens klónok valin-rezisztenciára végzett szkrinelésével olyan törzset (33B6) azonosítottunk, amely a plazmidot spontán elvesztette, és a kívánt allélt hordozta.

Ezt követően a szénhidrát-felhasználási reakcióút génjeibe két mutációt iktattunk be, hogy lehetővé tegyük a gazdasejt már rekombináns gazdasejtektől – egyszerű szénhidrát-felhasználási teszt alkalmazásával – történő megkülönböztetését. A *fucP*- és *malE*-gének deléciós mutációját polimeráz láncreakcióval hoztuk létre, és a mutánsokat, egymástól függetlenül, β -laktamázt és levén-szacharázt tartalmazó plazmidvektorba (Bass és mtsai., ld. fentebb) foglaltuk. Mindkét teljes plazmidot egy W3110-származék kromoszómájába rekombináltuk, amely nem teszi lehetővé a plazmidvektor önálló replikációját (Bass és mtsai., ld. fentebb). Ezután, a 33B6-törzset a – kromoszómájába integrálódva *fucP* deléciós plazmidot hordozó – W3110-származékon növesztett P1-fág alkalmazásával karbenicillin-rezisztencia kialakítása céljából transzdukáltuk. Azokat a származékokat

választottuk ki, amelyek a leván szacharáz expresszálasára már nem voltak képesek (így szacharóz-rezisztensek voltak), és e sejteket a karbenicillin-rezisztencia megszűnésére és fruktózfelhasználási képességük hiányára szkríneltük. Az így kapott 49B2-törzseről polimeráz láncreakció alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy hordozza a tervezett fucP-deléciót.

Ugyanezeket a lépéseket megismételve a 49B2-törzshez malE-deléciót foglaltunk. A 49B2-törzset - kromoszómájába integrálódva malE-deléciós plazmidot hordozó törzsön növesztett - Pl-fággal transzdukálva karbenicillin-rezisztenciát alakítottunk ki. Ezután kiválasztottuk a szacharóz-rezisztens származékokat, és ezeket a karbenicillin-rezisztencia megszűnésére és a maltóz-felhasználási képesség hiányára szkríneltük. A malE-gén delécióját polimeráz láncreakcióval igazoltuk.

A 49A5-törzs lényeges tulajdonságai a következők:

- Tl-fággal szembeni rezisztencia;
- foszfátkoncentráció csökkentésekor (ami a termékszintézis indukálására alkalmazott lépés) nem képes az alkalikus foszfátáz túltermelésére;
- proteáz hiánya;
- nem fogékony a valin toxicitására;
- más gazdasejtektől szénhidrát-felhasználási teszt alkalmazásával megkülönböztethető.

2) 58B3-törzs

Az 58B3-törzs szintén a 33B6-törzsből származik. A Aprc::ps1080 genotípust [Bass és mtsai., ld. fentebb; Metcalf és mtsai.: Gene 138, 1-720 (1994)] Pl-

transzdukcióval a 33B6-törzs kanamicin-szenzitív (kan^s) származékába (56G4) foglaltuk, és azokat a sejttelpeket szelektáltuk ki, amelyek alacsony sókoncentrációjú, 50 %-os LB-tápközegen 42 °C-on jól növekedtek. A kan^s -törzs pKS16-plazmidből [Strauch és Beckwith (1989), ld. fentebb] származó degP -deléciót hordoz, ami kanamicin-szenzitív fenotípust eredményez. Ennek megfelelően, az 58B3-törzs kan^s -törzs, amely degP and prc deléciót egyaránt hordoz.

Az 58B3-törzs komplett genotípusa: W3110 ΔfhuA $\text{phoA}\Delta\text{E15}$ $\Delta(\text{argF-lac})169$ deoC degP41 $\text{IN}(\text{rrD-rrE})1$ Kan^s $\text{ilvG2096}(\text{Val}^F)$ Δprc .

3) 59A7-törzs

Ezt a törzset a Prc -szuppresszor (Spr -mutáns) 58B3-törzsbe történő bejuttatásával hoztuk létre. Az 51B9-törzs (tonA prc prc sup zeg722::Tn10) P1-fág lizátumát 58B3-törzsbe transzdukáltuk, majd a telepeket tet -rezisztenciára szelektáltuk és Prc -szuppresszor fenotípusra szkrineltük (vagyis a kis sókoncentrációjú, 50 %-os LB-tápközegen 42°C-on jó növekedést mutató telepeket azonosítottuk). Az új törzset 58F1-nek neveztük el. A Δprc -mutáns 42°C-on nem maradt életben. Az 58F1-törzsből a tetraciklin-rezisztencia gént Malloy-lemezekre történő szélesztéssel eltávolítottuk, miáltal egy tet^s -szenzitív törzset (59A7) kaptunk. Az 59A7-törzs komplett genotípusa a következő: W3110 ΔfhuA $\text{phoA}\Delta\text{E15}$ $\Delta(\text{argF-lac})169$ deoC degP41 $\text{IN}(\text{rrD-rrE})1$ Kan^s $\text{ilvG2096}(\text{Val}^F)$ Δprc sprW148R .

Az eredeti 51B9-törzs tartalmaz egy Prc -szuppresszort

(Spr), amely W148R pontmutációt hordozó, ugyanúgy, mint a 43H1- és 59A7-törzsben lévő Spr.

4) 43H1-törzs

A 43H1-törzs teljes genotípusa nagyon hasonló a 49A5-törzséhez: W3110 AfhuA phoAAE15 $\Delta(\arg F-lac)$ 169 degP41($\Delta pst1-Kan^r$) IN(rrD-rrE)1 ilvG2096(Val^r) ptr3 $\Delta ompT$ prc::kanr sprW148R. A 43H1-törzs hárommal több proteáz-markert tartalmaz, mint a 49A5. Ez a három plusz marker a Ptr3, OmpT és Prc. Ez a törzs az Spr-ben pontmutációt (W148R) hordoz, és kanamicin-rezisztens.

5) 58H2-törzs

The 43H1-törzset a 42E3-törzsön növesztett Pl-fággal tetraciklin-rezisztenssé transzdukáltuk. Az így kapott törzsben (58F9) a prc::kan^r mutáció kijavításra került, így kanamicin-rezistens (kan^s) lett. Az 58F9-törzset az eda::Tn10 eltávolítása céljából minimál glükuronsav-tápközegre szélesztettük. Az így létrehozott új törzs (58H2) kanamicin-szenzitív (kan^s), és háromszoros proteáz mutáns, ugyanakkor, vad típusú prc-gént hordoz. Az 58H2-törzs teljes genotípusa a következő: W3110 AfhuA phoAAE15 $\Delta(\arg F-lac)$ 169 degP41($\Delta pst1-Kan^r$) IN(rrD-rrE)1 ilvG2096(Val^r) ptr3 $\Delta ompT$ sprW148R.

6) 45F8-törzs

A 45F8-törzs teljes genotípusa a következő: W3110 AfhuA $\Delta(\arg F-lac)$ 169 degP41 Kan^s $\Delta ompT$ ptr3 ilvG2096(Val^r) phoS*(T104). A 45F8 három proteáz-markert tartalmazó phoS-törzs.

7) 41H1-törzs

A 41H1-törzs teljes genotípusa: W3110 AfhuA phoS⁺ (T104) Δ (argF-lac)169 degP41 (Δ pstI-Kan^r) ptr3 ilvG2096 (Val^r), 37°C-on T-adaptált. Ez a törzs két proteáz-markert tartalmazó phoS-törzs.

8) 33D3-törzs

A 33D3-törzs teljes genotípusa a következő: W3110 AfhuA ptr3 lacIq lacL8 Δ ompT degP41 (Δ pstI-kan^r). A konstrukció leírását illetően ld. pl. az 5 789 199 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást.

K) Ráztatott lombikos és fermentációs tenyésztés

A ráztatott lombikos kísérlethez Luria-Bertani (LB) táplevest és 5 μ g/mL AmpicillinTM antibiotikumot tartalmazó C.R.A.P minimál tápközeget alkalmaztunk. A C.R.A.P. minimál tápközeget a következők szerint állítottuk elő: 3,57 g (NH₄)₂SO₄-ot, 0,71 g Na-citrát·2H₂O-t, 1,07 g KCl-et, 5,36 g élesztőkivonatot és 5,36 g HYCASE SF-SHEFFIELDTM-et elegyítettünk, majd az elegy pH-ját kálium-hidroxiddal 7,3-re állítottuk be, és térfogatát ioncserélt vízzel 872 mL-re egészítettük ki. A kapott elegyet autoklávoztuk, majd 55 °C-ra hűtöttük, és 110 mL 1M MOPS-puffert (pH = 7,3), 11 mL 50 %-os glükózt és 7,0 mL 1M magnézium-szulfát oldatot adtunk hozzá.

Az itt alkalmazott *E. coli* fermentációs eljárás a fentebb meghatározott nagy sejtsűrűségű fermentáció. Nagyobb sejtsűrűségek eléréséhez a tenyészethez folyamatosan ammóniát adagoltunk, és a fermentáció bizonyos stádiumaiban, a

sejtszaporodás elősegítése érdekében, további nyomelemeket (P, K, S és Mg) adtunk. A tápanyagmennyiség csökkentése egy másik folyamatot eredményezett, amelyre - azonos minőségű termék mellett - a tápleves kisebb végső optikai denzitása volt jellemző; ezt a folyamatot kis sejtsűrűségű fermentációknak nevezzük.

10-15 %-os DMSO-ban 1,5 mL tenyészetet tartalmazó fiolát - 0,5 mL tetraciklin-oldattal (5 mg/mL) és 2,5 mL 1M nátrium-foszfát oldattal kiegészített - 500 mL LB-tápközeget tartalmazó 1 literes rázólabákban felolvasztottunk. Ezt az oltótenyészetet 30 °C-on hozzávetőleg 16 óra hosszat inkubáltuk, majd 10 literes fermentor beoltására használtuk.

A fermentort először 6,5 liter tápközeeggel töltöttük fel, melynek összetétele a következő volt: kb. 4,4 g glükóz, 100 mL 1M magnézium-szulfát, 10 mL nyomelem-oldat (1 liter össztérfogatban 100 mL sósav, 27 g vas(III)-klorid-hexahidrát, 8 g cink-szulfát-heptahidrát, 7 g kobalt-klorid-hexahidrát, 7 g nátrium-molibdát-dihidrát, 8 g réz(II)-szulfát-pentahidrát, 2 g bórsav és 5 g mangán-szulfát-monohidrát); 10 mL PERMAX ADJUVANT 27™ (vagy hasonló habzásgátló); 1 tasak HCD-sókeverék (37,5 g ammónium-szulfát, 19,5 g kétbázisú kálium-foszfát, 9,75 g egybázisú nátrium-foszfát-dihidrát, 7,5 g nátrium-citrát-dihidrát és 11,3 g egybázisú kálium-foszfát); és 200 g NZ Amine A (protein-hidrolizátum). A fermentációt 30 °C-on, 10 slpm levegőárammal végeztük, és a pH-t $7,0 \pm 0,2$ értéken tartottuk (bár esetenként e tartományon kívüli pH-értékek is előfor-

dultak). A fermentor ellennyomását és a keverési sebességet az oxigénbeviteli sebesség és, következésképpen, a celluláris respirációs ráta szabályozásának megfelelően állítottuk be.

Miután a fermentort a rázólabiból származó, sejttartalmú tápközeggel beoltottuk, a tenyészetet - a tömény glükózoldat fermentorba történő betáplálására számítógépes algoritmus alkalmazásával - nagy sejtsűrűség eléréséig inkubáltuk. A fermentorba - a pH szabályozásához megfelelő mennyiségben - ammónium-hidroxidot (58 %-os oldat) és kén-savat (24 %-os oldat) adagoltunk. A tápközeg habzásának visszaszorítása érdekében, bizonyos esetekben, habzásgátló anyagot is alkalmaztunk. Ha a tenyészet sejtsűrűsége kb. 40-es OD_{550} -értéket ért el, a fermentorba újabb 100 mL 1M magnézium-szulfát oldatot adtunk. Ezenfelül, mikor a tenyészet kb. 20-as OD_{550} -értéket ért el, a fermentorba 2,5 mL/perc sebességgel tömény sóoldatot (1 liter vízben kb. 10 g ammónium-szulfát, 26 g kétbázisú kálium-foszfát, 13 g egybázisú nátrium-foszfát-dihidrát, 2 g nátrium-citrát-dihidrát és 15 g egybázisú kálium-foszfát) adagoltunk (összesen 1250 mL mennyiségben). A fermentációkat rendszerint 72-80 óra hosszat folytattuk.

A fermentáció során az oldott oxigénkoncentráció fermentációra megállapított alapértékének elérésekor a tömény glükózoldatot az oldott oxigén mérőjele alapján adagoltuk, miáltal az oldott oxigén koncentrációját az alapértékre szabályoztuk be. Ennek megfelelően, e szabályozási rendszerben a fermentor üzemi paramétereinek (úgy mint a

fermentorban az oxigénátviteli képességet befolyásoló keverési sebesség és az ellennyomás) módosításai hatással vannak a sejtek oxigénfelvételi és anyagcsere sebességére.

A fermentáció során kiáramló gáz összetételének ellenőrzésére tömegspektrométert alkalmaztunk, ami lehetővé tette a fermentorban az oxigénfelvételi és a szén-dioxid-képződési sebesség kiszámítását.

A tenyészet hozzávetőleg 220-as OD_{550} -értékének elérésekor a keverést a kezdeti 1000-es percenkénti fordulatszámról kb. 12 óra alatt hozzávetőleg 725-ös percenkénti fordulatszámra csökkentettük.

A pMS421- és pyc34-plazmiddal (amelyben a nehéz és könnyű lánc expressziójának szabályozására *tacII*-promótert alkalmaztunk) transzformált sejtek vagy a dupla promóteres pxC18-7T3-plazmiddal (amelyben a *tacII*-promótert a nehéz lánc expressziójának szabályozására alkalmaztuk) transzformált sejtek fermentálása esetén a 220-as OD_{550} -érték elérése után kb. 12 órával a tenyészethez - a nehéz és könnyű lánc szintézisének (a pyc34 esetében), illetve a nehéz lánc szintézisének (a pxC18-7T3 esetében) indukálása céljából - 50 mL 200 mM IPTG-t adtunk.

Eredmények

A) A kappa könnyű lánc hasítási termékeinek felismerése és azonosítása

Oldható *E. coli* extraktumokat (HSE, ld. az „Anyagok és módszerek” szakaszban) és a maradék sejttöledékeket (melyeket SDS mintafellevő pufferben szuszpendáltunk) SDS-PAGE

gélelektroforézissel analizáltuk. A minták a pS1130-plazmidot hordozó - rhuF(ab)'2-LZ (xCD18) antitestet termelő - 49A5-törzs nagy sejtsűrűségű fermentációja során gyűjtött 20 OD-mL sejttöledékekből származtak. Az oldható frakcióban a kappa könnyű lánc 115 aminosavas hasítási fragmensét (LC-115) azonosítottuk. Az oldhatatlan frakcióban a kappa könnyű lánc 182 aminosavas hasítási fragmensét (LC-182) mutattuk ki. A fragmenseket PVDF-membránra vittük fel és szekvencia-analízisnek vetettük alá. Mindkét fragmens a kappa könnyű lánc érett alakjának megfelelő N-terminálist tartalmazott. A fragmensek molekulatömege - tömegspektrometriás analízissel végzett meghatározás alapján - 12488,5 D-nak, illetve 19857,2 D-nak adódott. A proteolitikus hasítási hely az LC-115 fragmensben a 115. valin és 116. fenilalanin között, míg az LC-182 fragmensben a 182. szerin és 183. lizin között helyezkedett el. Csak egy hely tűnt tipikus Proc-hasítási helynek.

E fermentáció végén egy újabb 20 OD-mL *E. coli* sejttöledéket kétdimenziós gélelektroforézissel analizáltunk. A sejttöledékből készített *E. coli* sejtlizátumot (kb. 40 µg proteintartalom), Champion és mtsai. leírása (ld. fentebb) szerint, rehidratált oldattal elegyítettük. A 49A5/pS1130 fermentációból származó sejtek kétdimenziós gélmintázatán a kappa könnyű lánc-specifikus foltokat a termelő sejtek géljének a 49A5/pBR322 fermentációból hasonló időpontban vett sejttöledékek („üres sejtek”) géljének összehasonlításával azonosítottuk. A sejttöledékeket a két fermentációból azonos időpontban gyűjtöttük (hasonló metabolikus stádiumban lévő

sejteket feltételezve). A kappa könnyű láncoknak megfelelő foltokat alkalikus foszfatázzal konjugált anti-humán kappa könnyű lánc antitest alkalmazásával végzett immunblot-analízissel azonosítottuk.

A kétdimenziós gélen - az egydimenziós gélelektroforézissel azonosított két fő fragmens mellett - megjelent az intakt könnyű lánc, az intakt könnyű lánc izoalakja, valamint legalább öt további könnyű lánc fragmens (ld. a 6. ábrát). A megfelelő foltokat kimostuk a gélről és szekvencia-analízisnek vetettük alá. Valamennyi LC-specifikus peptid pontos N-terminálist tartalmazott, ami azt jelzi, hogy érési folyamatuk - az STII-szignál lehasításával - megfelelően zajlott le. E peptideket - hozzávetőleges tömegük meghatározása érdekében - tömegspektrometriával analizáltuk. A kisméretű fragmensek nyomnyi mennyiségének jelenléte miatt (e fragmensek hasítási helyének megállapításához szükséges) pontos tömegadatokat nem tudunk meghatározni.

9-es pI-érték körül a kappa LC-115 fragmenssel együtt három kisméretű fragmens csoportosult. A negyedik kisméretű fragmens pI-értéke kb. 6,5, míg az ötödiké megegyezett az LC-182 fragmensével (pI = kb. 6). Ezen LC-fragmensek oldékonyságának meghatározása céljából egy azonos sejttöledekből származó HSE-extraktumot kétdimenziós gélre vittünk fel. Az LC-182-fragmens csak a nem oldható frakcióban létezett.

B) A kappa könnyű lánc hasításáért kizárólag a Prc-proteáz felelős

Az anti-CD18 Fab'2-L2-molekulát expresszáló *E. coli* proteáz-mutánsok (49A5, 45F8, 41H1 és 43H1) négy különböző fermentációjából származó sejtek oldhatatlan frakcióját egydimenziós SDS-PAGE-gélekre vittük fel. Az LC-182-fragmens proteolitikus hasítása a négy minta közül háromban volt megfigyelhető (a prc-deleció 43H1-törzsben nem), ami azt jelzi, hogy a Prc-proteázok szerepet játszanak a kappa könnyű lánc hasításában. Az LC-115-fragmensnek megfelelő 1. csúcs, amely a prc+ 49A5-törzsből származó mintákban jelen volt, az AME5™/reverz fázisú dupla oszlopos vizsgálati eljárással felbontott kromatogramok összehasonlítása alapján, ugyancsak eltűnt a 43H1-eredetű mintákból. Az AME5™/reverz fázisú dupla oszlopos vizsgálati eljárással a kappa könnyű láncot tartalmazó antitest-fajták szelektíven adszorbeálhatók, majd azok öt csúcsra bonthatók szét (ld. az „Anyagok és módszerek” szakaszt).

A 43H1-eredetű sejtüledékek kétdimenziós géljének vizsgálata során azt találtuk, hogy a gélről nemcsak az LC-115 és LC-182 fragmens, hanem az összes többi könnyű lánc-eredetű kisméretű fragmens is eltűnt (ld. 7. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a kappa könnyű láncok hasításáért egyedül a Prc-proteáz felelős. A 43H1-sejtek üledéke kis sejtsűrűségű fermentációból származott.

C) Gazdatörzs létrehozása annak igazolása céljából, hogy a kapp könnyű lánc hasításában egyedül a Proc-enzim játszik szerepet

1) proc-deléció törzs kijavítása proc-pozitívvá

Annak bizonyítékát, hogy a kapp könnyű lánc hasításában egyedül a Proc-proteáz játszik szerepet, a 43H1-törzs (négy proteáz-markert hordozó proc-negatív gazdatörzs) proc-pozitív, három proteázos törzssé (58H2) történő kijavításával kaptuk. A 42E3-törzs eda-51::tn10-et hordoz, amely a proc-vel együttesen transzdukálható. A 43H1-törzset 42E3-sejteken növesztett Fl-fággal tetraciklín-rezisztenssé (tet^r) transzdukáltuk, majd az így kapott törzsben (58F9) kijavítottuk a proc::kan^r mutációt, miáltal az kanamicin-érzékeny (kan^s) lett. Ezt a törzset - az eda::Tn10 eltávolítása céljából - minimál glükuronsav-tápközegre szélesztettük. Az így létrehozott törzs (58H2) háromszoros proteáz-mutánssá vált, és vad típusú proc-gént hordozott. Ez az izolátum egy transzduktáns vagy egy spontán Eda⁺-izolátum. A proc⁺ genotípust polimeráz láncreakcióval igazoltuk. Az 58H2-törzs tartalmazza a 43H1-törzsből származó proc-szuppresszort (spr^{W148R}) is, és kanamicin-érzékeny. Az 58H2-törzsben az LC-fragmensek újbóli megjelenését az AME5TM/reverz fázisú dupla oszlopos vizsgálati eljárással detektáltuk (ld. 8. ábra).

2) A proc-gén deléciójával egy natív törzset proc-negatívvá alakítottunk

A 49A5-törzs a proc-gén vonatkozásában vad típusú törzs (ld. fentebb). E törzs genetikai hátterében a proc deléciója

eredményeként az 58B3-törzset kaptuk, és a sejtkivonatokat az AME5™/RP dupla oszlopos eljárással analizálva azt találtuk, hogy az LC-115 fragmens (1. csúcs) eltűnt. Az 58B3-törzs a 33B6-törzsből származik, amely csak egy proteáz-markert (DegP) hordoz. A 33B6-törzs kanamicin-érzékeny származékába (56G4) Pl-transzdukcióval Aprc::pS1080-mutációt (Bass és mtsai., ld. fentebb; Metcalf és mtsai., ld. fentebb) juttattunk be, miáltal a két proteáz-markeres degP Aprc 59A7-törzset kaptuk. A hét törzsre kapott hasítási eredményeket az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

<i>E. coli</i> gazdatörzs	Proteáz-marker	Könnyű lánc hasítás
49A5	DegP	+
45F8	DegP Ptr3	+
41H1	DegP Ptr3 OmpT	+
43H1	DegP Ptr3 OmpT ΔPrc Spr ^{W148P}	-
58H2	DegP Ptr3 OmpT Spr ^{W148P}	+
58B3	DegP ΔPrc	-
59A7	DegP ΔPrc Spr ^{W148K}	-

D) Az rhuFab'2-LZ (xCD18) hozamának javítása prc-negatív gazdasejtekben

1) Rázólombikos tenyésztési eredmények

Három, rhuFab'2-LZ (xCD18) antitestet expresszáló törzset (49A5, 43H1 és 58H2) először 30 °C-on egy éjszakán keresztül, ampicillinnel kiegészített LP-tápoldatban tenyész-

tettük, majd a tenyészetek mindegyikét egyenlő mennyiségben 25 mL - ampicillinnel kiegészített - C.R.A.P. minimál tápközeget tartalmazó rázó lombikokba oltottuk, és 30 °C-on egy éjszakán át ráztuk. Az oldható lizátumok (HSE) elkészítéséhez a tenyészetből 20 OD-mL sejttöledékeket gyűjtöttünk, és 530 µL-ből 25 µL-t AMESTM/reverz fázisú oszlopra töltöttünk.

A 8. ábrán oszlopgrafikonon szemléltetjük az e módszerrel szétválasztott öt csúcsot. Az Y-tengelyen az 1-5. csúcsokra kapott specifikus csúcs alatti területeket tüntettük fel (ld. az „Anyagok és módszerek” szakaszt). Az X-tengelyen az rhuFab'2-LZ (xCD18) antitestet termelő törzsek vannak feltüntetve. A két prc+ törzs (49A5 és 58H2) csaknem azonos mennyiségű terméket termelt, mint ahogy az LC-115-fragmens mennyisége (1. csúcs) is mindkettőben csaknem azonos volt, miközben a Aprc 43H1-törzsben az 1. csúcsnak megfelelő fragmens hiányzott, az 5. csúcsnak megfelelő termék-ből viszont több volt jelen. Ez a grafikon jól mutatja az antitest-fragmensek megoszlását. A 43H1-gazdatörzsben az intakt könnyű lánc és a könnyű lánc dimer nagyobb mennyiségben volt jelen, mint a 49A5- és 58H2-törzsben. A rázó lombikban a prc-negatív gazdatörzs csaknem ötször nagyobb mennyiségű rhuFab'2-LZ (xCD18) antitestet termelt, mint a natív prc-gént hordozó törzsek.

2) Fermentációs eredmények

A standard nagy sejtsűrűségű fermentációval kapott átlagos rhuFab'2-LZ (xCD18) titer a vad típusú prc-gént hordozó gazdatörzs (49A5, n = 6) esetében 893 mg/L-nek adódott

(AME5™/RP dupla oszlopos eljárással). A 43H1/pS1130 fermentációval közel kétszeres titert kaptunk. A 43H1- és a 49A5-gazdatörzs antitest-termelése közötti különbség rázó-lombikos (ötszörös), illetve fermentációs körülmények között tapasztalt eltérése (kétszeres vagy kisebb) - anélkül, hogy egy adott elmülethez ragaszkodnánk -, feltehetően a termékek szekréciója hatékonyságának különbségéből adódik. A rázó-lombikos üledékek teljes lizátumának vizsgálata során a prc+ háttérben az antitest-fragmensek csupán 50 %-a volt megfelelően érett alakban, míg a rázó-lombikból származó 43H1-sejtek lizátuma, illetve a fermentációból származó sejtek (prc+ és prc- egyaránt) termelt antitest-fragmensek 100 %-os érést mutattak. A Prc-protein érési folyamata secY-, secA-dependensnek bizonyult [Hara és mtsai. (1991), ld. fentebb]. Úgy véljük, hogy a Prc-protein a transzlokációt illetően kompetícióban állt az antitest-fragmensekkel.

3) Az antitest-fragmensek össz-expressziójának mérése

Az antitestek összehajtogatódása („folding”) és összerendeződése hatékonyságának vizsgálata céljából, az „Anyagok és módszerek” szakaszban leírtak szerint, a teljes fermentációs tápleves-minták POROS™-oszlop vizsgálati eljárását fejlesztettük ki. A három anti-CD13 HCD-fermentációból származó teljes tápleves-minták azonos mennyiségének különböző gazdatörzsekben történő összehasonlításakor azt találtuk, hogy a 43H1-törzs fermentációja hasonló mennyiségű nehéz lánc expresszióját eredményezte, mint a 49A5-fermentáció, az intakt kappa könnyű lánc azonban nagyobb mennyiségben termelődött (ld. 2. táblázat). Az rhuFab'2-L2

(xCD18) titer a 43H1-törzs esetében 1830 g/L, míg a 49A5-törzs esetében 887,8 mg/L volt. Az 59A7-fermentáció nem csupán extra antitest-fragmenseket eredményezett, hanem ez adta a legnagyobb rhuFab'2-LZ (xCD18) titert is (2403 mg/L).

2. táblázat

Különböző, rhuFab'2-LZ (xCD18) antitestet expresszáló törzsek össz antitest-fragmens expressziója és Fab'2-LZ titere

Fermentációs min-ták	Gazda	Össz LC (g/L)	Össz HC (g/L)	Össz HC+LC (g/L)	Fab'2-LZ (mg/L)	Idő (óra)
1.	49A5	2,23	2,27	4,5		40
2.	49A5	4,75	3,96	8,71	887,8	72
3.	43H1	6,57	4	10,57		62
4.	43H1	7,38	4,18	11,56	1830	72
5.	59A7	12,49	6,87	19,36		68
6.	59A7	13,76	7,46	21,22	2403	72

E) A sejtek stacionárius fázisban való életben maradásához Prc-szuppresszorra van szükség

Felismertük, hogy a degP- és prc-deléciót hordozó 58B3-törzsben az anti-CD18 Fab'2-LZ-molekula expresszáltatására irányuló HCD-fermentáció meghosszabbított stacionárius sejtszaporodási fázisa során sejtlízis következett be. A sejtlízis a beoltást követően 50 órával kezdődött, s csupán 320 mg/L rhuFab'2-LZ (xCD18) termelődött, míg az 59A7/pS1130 HCD-fermentáció stacionárius fázisban a 72. óráig jó sejtszaporodást eredményezett (kb. 300 OD₅₅₀-mL

sejtsűrűség eléréséig). A 9. ábrán e két fermentáció során megfigyelhető sejtszaporodást hasonlítjuk össze. Ezen túlmenően, a törzsben a nehéz lánc és könnyű lánc fragmensek rendkívül nagymértékű expresszióját figyeltük meg, ami az rhuFab'2-LZ (zCD18) molekula kitermelését 2403 mg/L-re növelte. A prc-deléciós 58B3- és 59A7-törzsből származó mintákban kárho könnyű lánc fragmenseket nem találtunk. A pro-szuppresszort (spr; amely Prc^{sup} -proteint kódol) eredetileg a 40A6-törzsből (prc:kan spr) spontán mutációként, azaz a prc-deléciós mutáns hőrezisztens revertánsaként izoláltuk. A gén szekvenálásával és konjugációs térképezésével megállapítottuk, hogy az *E. coli* kromoszómán hozzávetőleg a 48. percnél helyezkedik el. PCR-termékének nukleotidszekvenciája megegyezett az *E. coli* spr-gén Hara és mtsai. [(1996), ld. fentebb] által leírt szekvenciájával, azzal a különbséggel, hogy a 148. aminosav-pozícióban TGG→CGG pontmutációt tartalmaz, amely a triptofán argininnel történő helyettesítését (W148R) eredményezi. A pro-szuppresszorban az 59A7-törzsbe történő bejuttatást követően jelent meg a W148R-mutáció. A vad típusú spr-génről leírták, hogy a sejtburok („envelope”) frakcióba tartozó lipoproteint kódol, amely feltételezhetően egy peptidoglikán-hidrolizáló enzim [Hara és mtsai. (1996), ld. fentebb].

A Prc-szuppresszort a hozzá kötődő Tn10 alkalmazásával juttattuk be az 59A7-törzsbe, és olyan ko-transzduktánsokat szelektáltunk, amelyek egyszerre tetraciklin-rezisztensek és alacsony sótartalmú 50 %-os LB-táptalajon 42 °C-on sza-

porodni képesek. Az új pontmutáció akkor következett be, amikor a Tn10-et Malloy-lemezeken eltávolítottuk.

Az 58B3-, illetve 59A7-törzse anti-CD18 Fab'2 fermentációs eredményeinek összehasonlítása alapján bebizonyosodott, hogy Prc-szuppresszor szükséges a Δ Prc-mutáns sikeres szaporodásához (különösen nagy sejtsűrűségű *E. coli* fermentációban). Az 58B3 elnevezésű törzs az 59A7-törzsével pontosan azonos genotípusú [az spr-gén (W148R) kivételével], és standard HCD-fermentációban 50 óra elteltével nem életképes.

F) A Prc-deleció mutáns - a Prc hasítási helyének pozíciójának köszönhetően - képes a különböző antitest-termelési szintek növelésére

A 10. ábrán a humanizált kappa könnyű lánc aminosav-szekvenciáját (5. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be. A potenciális Prc-hasítási fragmensek számított pI-értékeit a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

A potenciális Prc-hasítási fragmensek számított pI-értékei

Számított pI- érték	Hasítási hely	Proteáz típusa	LC-fragmens
5,97	S/K	Szerin- specifikus	LC-182
9,14	V/F	Prc	LC-115
9,14	S/V	Szerin- specifikus	LC-114
9,14	V/A	Prc	LC-110

A 10. ábra és a 3. táblázat adatai alapján - anélkül, hogy egy konkrét elmélethez ragaszkodnánk -, úgy véljük, hogy a Prc-proteáz a kappa könnyű láncot annak C-terminális végétől 9 vagy 18 aminosav távolságra kezdte el hasítani, majd fokozatosan az N-terminális felé haladva az S/K helyet felnyitva szerin-specifikus proteáz működését tette lehetővé. Valószínű, hogy egy másik kappa könnyű lánc alak (esetleg egy másik „folding” stádiumban lévő alak) hasítása döntően a 115. aminosavig következett be. Sok potenciális hasítási termék olyan molekulatömegű és számított pI-értékű, amelyek jó egyezést mutatnak a kétdimenziós gélen megfigyelt kappa könnyű lánc foltokkal.

A 11. ábrán az látható, hogy a prc-deleció 43H1-törzsben az LC-182 fragmens hiányzik az anti-VEGF Fab-fragmenst, anti-CD18 Fab'2-LZ-molekulát, anti-CD18 Fab'2-LZ-6xHis-molekulát és szöveti faktor elleni Fab'2-LZ-6xHis-

molekulát expresszázó sejtekből. A cab2826-ból [33B6/D3H44-F(ab')₂] és cab2847-ből [43H1/D3H44-F(ab')₂] származó fermentációs minták a szöveti faktor elleni Fab'2-LZ-6xHis-molekula expresszáltatására irányuló nagy sejtsűrűségű fermentációk voltak. A fermentációra az anti-CD18 Fab'2-LZ-fermentációkra fentebb leírtakkal azonos, standard HCD-eljárást alkalmaztuk. A bab2793 az anti-CD18 Fab'2-LZ-6xHis-molekula expresszáltatása érdekében végzett 49A5/pAB3 fermentáció; a cab2846 az anti-CD18 Fab'2-LZ-molekula expresszáltatása céljából végzett 41H1/pS1130 fermentáció, míg a JJ81 (43H1/pY0317) és a JJ67 (43E7/pY0317) fermentációt az anti-VEGF Fab-fragmens expresszáltatása céljából végeztük. A cab2814 (49A5/pBR322) egy „üres” fermentáció, melynek során antitestet kódoló gén nélküli hasonló plazmidvázat alkalmaztunk.

A 20-as OD-értékű fermentációs üledékeket TRIS/EDTA/lizozim eleggyel extrahálva eltávolítottuk az oldható HSE-frakciókat. A visszamaradt üledékeket 400 µL 1xSDS mintafellevő pufferben és 20 µL β-merkaptocetanolban szuszpendáltuk, majd 5 percig 95 °C-on melegítettük. A kapott szuszpenzióból 5 µL-t 4-12 %-os NUPAGE™-gélre vittünk fel. A 33B6, 41H1, 49A5 és 43E7 törzsek prc+ törzsek, míg a 43H1 prc-negatív. A natív prc-törzs-eredetű minták mindegyike tartalmazta a 19,8 kD-os könnyű lánc bomlásterméket. A cab2829 (33B6/pD3H44TB) fermentációs mintában, amely szöveti faktor elleni Fab-fragmenst expresszált, szintén kimutatható volt ez a könnyű lánc bomlástermék. E fragmensek mindegyikét aminosav-szekvencia analízisnek vetettük alá,

és megállapítottuk, hogy pontos N-terminális könnyű lánc szekvenciákat tartalmaztak.

G) Az 59A7-törzs rázó lombikokban nagy mennyiségben expresszálja a CD18 elleni, His- vagy Lys-toldalékkal ellátott Fab'2-LZ-molekulákat és a Apo2L citoplazmikus proteint

A 4. táblázatban bemutatott további rázó lombikos adatok azt jelzik, hogy az 59A7-törzs a pAB3-at (His-toldalékot tartalmazó anti-CD18 Fab'2-LZ) nagyobb mennyiségben expresszálta, mint a 43H1- és 49A5-törzs. Az 59A7-törzs a pAB21-et (Lys-toldalékot tartalmazó Fab'2-LZ) 2,4-szer nagyobb mennyiségben expresszálja, mint a 33B6-törzs, míg az 59A7- és 43H1-törzs a pS1130-at (toldalék nélküli Fab'2-LZ) 2,9-szer nagyobb mennyiségben expresszálja, mint a 49A5-törzs. Mindazonáltal, a fermentációs eredmények minden esetben azt igazolták, hogy az 59A7-törzs a pS1130-expresszió tekintetében jobb, mint a 43H1-törzs.

Az Apo2L citoplazmikus protein (nem antitest) specifikus aktivitása 59A7-törzsben termeltetve 20-30 %-kal nagyobb, mint az 43E7-törzsben végzett termeltetés esetén (rázó lombikos tenyészetben). Mivel a 43E7-törzs nagyobb OD₅₅₀-érték eléréséig szaporodik, az összes expresszió hasonló mértékű. A 43E7-törzs prc- és spr-gén nélküli ompF ptr3 degP törzs.

4. táblázat

Az 59A7- és egyéb törzsek által rázó lombikos tenyészetben
expresszált nagyobb specifikus titerek

Törzs	Proteáz- marker(ek)	pS1130	pAB3	PAB21	Apc2L
		mg/L/OD- mL	mg/L/OD- mL	Mg/L/OD- mL	mg/L/OD- mL
33B6	DegP	N.A.	N.A.	0,33	N.A.
49A5	DegP	0,38	0,46	N.A.	N.A.
43H1	DegP Ptr3 OmpT Proc Spr ^{W148R}	1,1	0,3	N.A.	N.A.
59A7	DegP Spr ^{W148R}	1,1	0,7	0,8	14,4 15,2
43E7	DegP Ptr3 OmpT	N.A.	N.A.	N.A.	12,2 11,4

H) Az 59A7-törzs fermentációval jobb anti-CD18 Fab'2-LZ-
expressziót eredményez, mint más törzsek

Ahogy az 5. táblázatban látható, az 59A7-törzs a két
promóteres pxCd18-7T3-plazmidból nagyobb mértékben
expresszálta az anti-CD18 Fab'2-LZ-t, mint a 33D3-törzs, és
mint a poyc34-plazmidból nagyobb mértékben expresszálta az
anti-CD18 Fab'2-LZ-t, mint a 49A5-törzs.

5. táblázat

Az 59A7-törzs fermentációt követően nagyobb specifikus anti-CD18 Fab'2-LZ-titert eredményez, mint a két különböző plazmidot alkalmazó 33D3-, illetve 49A5-törzs

Törzs	Plazmid	Anti-CD18 Fab'2-LZ-titer* (mg/mL, átlag)
33D3	pxCD18-7T3/pMS421	2500
59A7	pxCD18-7T3/pMS421	4000
49A5	pcyc34/pMS421	341,3
59A7	pcyc34/pMS421	2067,1

Diszkusszió

Kísérletsorozatunkban az anti-CD18 Fab'2-LZ-molekulát expresszáló *E. coli* sejtekben a kappa könnyű lánc lebontását tanulmányoztuk. Korábbi vizsgálatok eredményeként számos lehetséges Prc-szubsztrátot azonosítottak, de - legjobb tudomásunk szerint - e proteáz szubsztrátjaként antitest-fragmenseket ez idáig nem írtak le. Kimutattuk, hogy a Prc az egyetlen proteáz, amely szerepet játszik a kappa könnyű lánc *E. coli* sejteken belüli hasításában. Bebizonyosodott, hogy a Prc-protein szelektíven meghatározott helyeken hasítja a kappa könnyű láncot, ami két fő fragmenst (LC-115 és LC-182) eredményez (melyeket kétdimenziós gélelektroforézissel figyeltünk meg). Mivel az egyik fragmens egy S/K hasítási termék, ami nem felel meg a Prc hasítási helyei sajátosságainak (Keiler és mtsai., ld. fentebb), részletesebb

analízist végeztünk. Azt találtuk, hogy *E. coli* sejtekben a kappa könnyű lánc lebomlása az *E. coli* egy periplazmikus proteázával (Prc/Tsp) áll összefüggésben. A kappa könnyű lánc hasítási termékeit különböző, anti-CD18 F(ab)'2-(leucin-cipzár)-molekulát expresszáló, proteolízis-deficiens törzsekből származó *E. coli* extraktumok analitikai módszerekkel (egy- és kétdimenziós SDS-PAGE-elektroforézissel, tömegspektrometriával és N-terminális szekvencia-analízissel) végzett elemzésével azonosítottuk, és igazoltuk, hogy a kappa könnyű lánc hasításáért felelős egyedüli proteáz a Prc/Tsp.

Azt találtuk, hogy a *degP* *prc*-deléció *prc*-szuppresszorral (*spr*-mutáns) alkotott speciális kombinációja olyan egyedi *E. coli* törzset eredményez, amely nagyon nagy mennyiségű, illetve nagyobb specifikus aktivitású rekombináns protein termelésére képes (amire példa az Apo2-ligandum és aktív antitest).

A *degP* *prc* *spr* törzs alkalmazásával végzett fermentáció nagy sejtsűrűségű szaporodást (300 vagy még nagyobb OD-értékig) és az anti-CD18 rhuFab'2-LZ-termék nagyobb hozamú termelését eredményezte, mint a vad típusú törzs vagy más, proteolízis-deficiens törzsek fermentációja.

A találmány szerinti fermentációs eljárás 72 óra alatt 100-200 g/L sejt-száraztömeg termelést tesz lehetővé, ami az egyik előnyös törzs, a *degP* *prc* *spr* kombinációt hordozó 59A7-törzs által termelt aktív antitest mennyiségének több, mint 200 %-os növekedését jelenti. Az 59A7-törzs teljes genotípusa a következő: W3110 Δ *fhuA* *phoA* Δ *E15* Δ (*argF-lac*)169

deoC degP41 IN(rrD-rrE)1 kan^r ilvG2096(Val^r) Aprc spr^{W148R}.
Az 59A7-törzs szülői törzse az 58B3, amely ugyanazon genetikai markereket tartalmazza, mint az 59A7 (a *prc*-szuppresszor, az *spr* kivételével). Az 58B3-törzs nagy sejtsűrűségű *E. coli* fermentációs eljárás stacionárius fázisában nem volt képes tartós sejtszaporodásra; kisebb mennyiségű antitestet termelt, mint a natív *prc*-törzs (49A5), amely szintén tartalmazza a *degP* deléciós markert és az 59A7-törzsével megegyező genotípusú, azzal a különbséggel, hogy a 49A5 kanamicin-rezisztens *prc*-natív törzs, míg az 59A7 kanamicin-érzékeny *Aprc*-törzs.

Ilyenformán, felismertük, hogy a *prc*-szuppresszor (*spr*) jelenléte kulcsfontosságú a *degP* *prc*-deléciós törzs kedvező sejtszaporodása és nagy antitest-termelése szempontjából; ez különösen érvényes a nagy sejtsűrűségű fermentációs eljárásra, de igaz a kis sejtsűrűségű fermentációra is.

A szimpla *DegPA* proteáz-mutáns és más, *degPA*-mutáns és többszörösen proteáz-deficiens törzsek nem termeltek kimagaslóan nagy mennyiségű rekombináns terméket. A korábban említett két törzs, a *degP rpoH* és *degP prc* több velük összehasonlított törzsnél nagyobb mennyiségű terméket expresszált, de közel sem olyan szinten, mint az 59A7-törzs. Közelebbről; a *degP prc* kombinációt hordozó 58B3-törzs - az *spr*-szuppresszor nélkül - nem mutatott semmilyen előnyt az antitest-fragmensek termelésében (amire példa az anti-CD18 Fab'2-LZ-molekula termelése).

Analitikai eredményeink azt bizonyítják, hogy a huma-

nizált anti-CD18 F(ab)'₂-LZ-molekulát expresszáló *E. coli* sejtekben a kappa könnyű lánc hasítása összefüggést mutat a periplazmikus C-terminális „processing” proteinnel (Prc). A Prc-protein az egyedüli proteáz, amely felelős a kappa könnyű lánc hasításáért, amit kétdimenziós gélelektroforézissel és az antitest-termelő törzsek génsebészeti manipulálásával mutattunk ki. Ha a Δprc-törzset natív prc-törzsé alakítottuk vissza, a kappa könnyű lánc hasítási termékei ismét megjelentek, ami igazolja, hogy a Prc-proteáz valóban az egyedüli enzim, amely szerepet játszik a kappa könnyű lánc hasításában. Hasonlóan, a natív prc-törzsből a prc-gén deletálása a könnyű lánc hasítási termékeinek eltűnését eredményezte. Mindkét törzset P1-transzdukcióval hoztuk létre.

Ezen túlmenően, összehasonlítottuk a proteolízis-mutáns (prc-deleciót hordozó vagy nem hordozó) *E. coli* sejtek által termelt anti-CD18 F(ab)'₂-LZ-titerekét is. A kapott eredmények azt bizonyították, hogy az 59A7-törzsre nagymértékű antitest-expresszió jellemző. Az anti-CD18 F(ab)'₂-LZ-molekula expresszáltatására különböző nukleinsavakat konstruáltunk, és az 59A7-törzsbe transzformált expressziós plazmidok mindegyike nagyobb mennyiségű antitest-fragmenst termelt, mint a szimpla degP proteáz-mutáns vagy az spr nélküli degP prc-mutáns. Egy másik törzs (43H1), amely az ompP és ptr3 mutációkon kívül degP prc spr genotípusú, nem növekedett olyan mértékben, mint az 59A7-törzs, annak ellenére, hogy ugyanazt az spr-mutációt hordozta, mint az 59A7 (vagyis az 520. pozícióban T helyett C-

t tartalmaz, ami a 148. triptofán argininnel történő helyettesítését eredményezi). A 43H1-törzs a fermentáció során az anti-CD18 F(ab)'2-L2 nagyobb titerét eredményezte, mint a 49A5 degP-törzs, de ez még mindig kisebb volt, mint az 59A7-törzs antitest-termelése.

Kieler és mtsai. (ld. fentebb) leírták, hogy a Prc-proteáz szubsztrátjait meghatározott számú helyen, de annál szélesebb szekvencia-specifitással hasítja. Kísérleteink eredményeként azt találtuk, hogy a kappa könnyű láncban a Prc-hasítási helyek a konstans régióban helyezkednek el, amely a különböző humanizált antitest-expressziós plazmidok létrehozására általánosan alkalmazott vázszekvencia. Eredményeink alapján arra számíthatunk, hogy a Prc-deléciós mutans alkalmazásával *E. coli* sejtekben javítható az különféle antitest-fragmensek [pl. Fab, Fab', Fab'2 (leucin-cipzárral vagy anélkül), illetve a teljes hosszúságú antitestek] expressziós szintje. A nehéz lánc C-terminálisán His- vagy Lys-toldalékot tartalmazó antitest-fragmensek termeltetése esetében szintén előnyös változásokra számíthatunk.

Az 59A7-törzs rázó lombikos tenyésztés esetén a pAB3 expresszállásában jobbnak bizonyult a 49A5-törzsnél, az Apo2L citoplazmikus protein specifikus expressziójában pedig a 43E7-törzsnél volt hatékonyabb, míg fermentációs eljárás alkalmazásakor a pS1130 és pcyc34 (amely a pS1130 tacII-promóteres párja) expresszálltatásában a 43H1- és 49A5-törzsnél mutatkozott előnyösebbnek. Ezenfelül, a két promóteres pXCD18-7T3-plazmid expresszálltatásában a 33D3-

törzsnél mutatott jobb teljesítményt.

2. példa

Anyagok és módszerek

A) Expressziós plazmidok

A D3H44-F(ab')₂-plazmidot és a pY0317tet20-plazmidot az 1. példában ismertettük.

B) Törzsek

Az anti-VEGF Fab-fragmens expresszáltatására az 1. példában leírtakhoz hasonló törzset (60C1) alkalmaztunk, amely az *E. coli* W3110-törzs származéka. A 60C1-törzs teljes genotípusa a következő: *W3110 ΔfhuA Δ(argF-lac)169 ptr3 degP41 Kan^r ΔompT ilvG2096(Val^r) Δ(nmpc-fepE) ΔssrA*. Hasonlóan a 45F8-törzshöz, három proteáz-markert tartalmaz, prc-t azonban nem.

A 43H1-, 59A7- és 33B6-törzset az 1. példában ismertettük.

C) Tenyésztési eljárás

A rázó lombikos tenyésztést az 1. példában leírtak szerint hajtottuk végre. A szöveti faktor elleni Fab'2-LZ-6xHis molekulát expresszáló rázó lombikos tenyészeteket 30 °C-on 42 órán át növesztettük, és összehasonlítás céljából különböző stádiumokban két mintasorozatot vettünk. Az anti-VEGF Fab-expresszió összehasonlításához két ismétléssel készítettünk tenyészeteket, és csak 24 órás mintákat vettünk.

D) Proteinek azonosítása

A kétdimenziós gélelektroforézist az 1. példában leírtak szerint végeztük.

Eredmények

A rázó lombikos tenyésztés eredményeit a 6. táblázatban mutatjuk be. Ahogy az 1. példában az anti-CD18 rhuFab'2-LZ-termelés esetében egyértelmű volt, a Prc-negatív 43H1- és 59A7-törzs az anti-VEGF Fab'-t és a szöveti faktor elleni (anti-TF) Fab'2-LZ-6xHis-molekulát nagyobb mennyiségben termelte, mint a Prc+ 60Cl- és 33B6-törzs.

A 12. ábrán egy kétdimenziós gélt mutatunk be, amelyen látható, hogy az anti-VEGF Fab-t (pY0317tet20) expresszáló prc-negatív 59A7-törzsben a prc-deleció megszünteti az összes anti-VEGF könnyű lánc hasítási terméket és két anti-VEGF nehéz lánc fragmenst (amelyek a prc+ törzsben megtalálhatók), bár az 59A7-törzsben két különböző nehéz lánc fragmenst is felfedeztünk, amelyek OmpT- vagy Ptr3-hasítási termékek lehetnek. A 13. ábrán bemutatott kétdimenziós gélen látható, hogy a heterológ polipeptidként anti-VEGF Fab-t (pY0317tet20) expresszáló 60Cl-törzs (prc+) több anti-VEGF könnyű lánc hasítási terméket és két lebontott nehéz lánc fragmenst tartalmaz.

6. táblázat

Törzs	24 órás tenyésztés	42 órás tenyésztés	pst-státusz
	anti-VEGF Fab (mg/L/OD)		
59A7/pY0317 tet20	2,44		-
59A7/pY0317 tet20	2,53		-
60C1/pY0317 tet20	0,82		+
60C1/pY0317 tet20	1,03		+
	anti-TF Fab'2 LZ-6xhis (mg/L/OD)		
33B6/pd3h44 f2	0,68	0,54	+
43H1/pd3h44 f2	1,60	1,88	-
59A7/pd3h44 f2	2,18	3,98	-

Szekvencialista

SZEKVENCIAK SZÁMA: 10

(2) TUDNIVALÓK AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 1951 bázispár
- (B) TÍPUS: DNS
- (C) SZÁL: Egyszálú
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-1951
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50
TCATTGCTGA GTTGTIATTT AAGCTTTGGA GATTATCGTC ACTGCAATGC 100
TTCGCAATAT GGCGCAAAAT GACCAACAGC GGTGATTGA TCAGGTAGAG 150
GGGGCGCTGT ACGAGGTAAA GCCCGATGCC AGCATTCCTG ACGACGATAC 200
GGAGCTGCTG CGCGATTACG TAAAGAAAGTT ATTGAAGCAT CCTCGTCAGT 250
AAAAAGTTAA TCTTTTCAAC AGCTGTCATA AAGTTGTCAC GGCCGAGACT 300
TATAGTCGCT TTGTTTTTAT TTTTAAATGT ATTTGTAAC TGAATTCGAG 350
CTCGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGGTTGA GGTGATTTTA TGAAAAAGAA 400
TATCGCATTT CTTCTTGCAT CTATGTTCTG TTTTCTATT GCTACAAACG 450
CGTACGCTGA TATCCAGTTG ACCCAGTCCC CGAGCTCCCT GTCCGCTCT 500
GTGGGCGATA GGGTCACCAT CACCTGCAGC GCAAGTCAGG ATATTAGCAA 550
CTATTTAAAC TGGTATCAAC AGAAACCAGG AAAAGCTCCG AAAC TACTGA 600
TTTACTTCAC CTCCTCTCTC CACTCTGGAG TCCCTTCTCG CTTCTCTGGA 650
TCCGGTTCTG GGACGGATTA CACTCTGACC ATCAGCAGTC TGCAGCCAGA 700
AGACTTCGCA ACTTATTACT GTCAACAGTA TAGCACCCTG CCGTGGACGT 750
TTGGACAGGG TACCAAGGTG GASATCAAAC GAACTGTGGC TGCACCATCT 800
GTCTTCAICT TCCCGCCATC TGATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCTTC 850
TGTTGTGTGC CTGCTGAATA ACTTCTATCC CAGAGAGGCC AAAGTACAGT 900

GGAAGGTGGA TAACGCCCTC CAATCGGGTA ACTCCCAGGA GAGTGTGACA 950
GAGCAGGACA GCAAGGACAG CACCTACAGC CTCAGCAGCA CCCTGACGCT 1000
GAGCAGAAGCA GACTACGAGA AACACAAAGT CTACGCCCTGC GAAGTCACCC 1050
ATCAGGGCCT GAGCTCGCCC GTCACAAAGA GCTTCAACAG GGGAGAGTGT 1100
TAAGCTGATC CTCTACGCCG GACGCATCGT GGCCCTAGTA CGCAACTAGT 1150
CGTAAAAAGG GTATCTAGAG GTTGAGGTGA TTTTATGAAA AAGAATATCG 1200
CATTTCTTCT TGCATCTATG TTCGTTTTTT CTATTGCTAC AAACGCGTAC 1250
GCTGAGGTTT AGCTGGTGGA GTCTGGCGGT GGCCCTGGTG AGCCAGGGGG 1300
CTCACTCCGT TTGTCTGTG CAGCTTCTGG CTATACCTTC ACCAACTATG 1350
GTATGAACTG GATCCGTCAG GCCCCGGTA AGGGCCTGGA ATGGGTTGGA 1400
TGGATTAACA CCTATACCGG TGAACCGACC TATGCTGCGG ATTTCAAACG 1450
TCGTTTTACT ATATCTGCAG ACACCTCCAG CAACACAGTT TACCTGCAGA 1500
TGAACAGCCT GCGCGCTGAG GACACTGCCG TCTATTACTG TGCAAAGTAC 1550
CCGCACTATT ATGGGAGCAG CCACTGGTAT TTCGACGTCT GGGGTCAAGG 1600
AACCCTGGTC ACCGTCTCCT CGGCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC 1650
CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC 1700
TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC 1750
AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGCTGTC CTACAGTCCT 1800
CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG 1850
GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA 1900
GGTCGACAAG AAAGTTGAGC CCAATCTTG TGACAAAAC CACCTCTAGA 1950
A 1951

(2) TUDNIVALÓK A 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 491 aminosav
- (B) TÍPUS: PRT
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-491
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe	1	5	10	15
Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	20	25	30	
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	35	40	45	
Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	50	55	60	
Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Thr	Ser	65	70	75	
Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	80	85	90	
Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	95	100	105	
Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	Thr	110	115	120	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	125	130	135	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	140	145	150	
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	155	160	165	
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	170	175	180	
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	185	190	195	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	200	205	210	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	215	220	225	
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Met	Lys	Lys	230	235	240	
Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe	Ser	Ile	Ala	245	250	255	
Thr	Asn	Ala	Tyr	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	260	265	270	

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser	275	280	285
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala	290	295	300
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr	305	310	315
Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Ile	320	325	330
Ser Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser	335	340	345
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro	350	355	360
His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln	365	370	375
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	380	385	390
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	395	400	405
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	410	415	420
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	425	430	435
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	440	445	450
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	455	460	465
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys	470	475	480
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu	485	490	

(2) TUDNIVALÓK A 3. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 1042 bázispár
- (B) TÍPUS: DNS
- (C) SZÁL:
- (D) LÁNC:

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 3. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

TTTCCTCACT GACTATAAAA GAATAGAGAA GGAAGGGCTT CAGTGACCGG 50

CTGCCTGGCT GACTTACAGC AGTCAGACTC TGACAGGATC ATGGCTATGA 100
 TGGAGGTCCA GGGGGGACCC AGCCTGGGAC AGACCTGCGT GCTGATCGTG 150
 ATCTTCACAG TGCTCCTGCA GTCTCTCTGT GTGGCTGTAA CTTACGTGTA 200
 CTTTACCAAC GAGCTGAAGC AGATGCAGGA CAAGTACTCC AAAAGTGGCA 250
 TTGCTTGTTT CTTAAAAGAA GATGACAGTT ATTGGGACCC CAATGACGAA 300
 GAGAGTATGA ACAGCCCCTG CTGGCAAGTC AAGTGGCAAC TCCGTCAGCT 350
 CGTTAGAAAG ATGATTTTGA GAACCTCTGA GGAAACCATT TCTACAGTTC 400
 AAGAAAAGCA ACAAAATATT TCTCCCTAG TGAGAGAAAG AGGTCCCTCAG 450
 AGAGTAGCAG CTCACATAAC TGGGACCAGA GGAAGAAGCA ACACATTGTC 500
 TTCTCCAAAC TCCAAGAATG AAAAGGCTCT GGGCCGCAAA ATAAACTCCT 550
 GGGAAATCATC AAGGAGTGGG CATTCATTCC TGAGCAACTT GCACTTGAGG 600
 AATGGTGAAC TGGTCATCCA TGA AAAAGGG TTTTACTACA TCTATTCCCA 650
 AACATACTTT CGATTTTCAGG AGGAAATAAA AGAAAACACA AAGAACGACA 700
 AACAAATGGT CCAATATATT TACAAATACA CAAGTTATCC TGACCCTATA 750
 TTGTTGATGA AAAGTGCTAG AAATAGTTGT TGGTCTAAAG ATGCAGAATA 800
 TGGACTCTAT TCCATCTATC AAGGGGGAAT ATTTEAGCTT AAGGAAAATG 850
 ACAGAATTTT TGTTTCTGTA ACAATGAGC ACTTGATAGA CATGGACCAT 900
 GAAGCCAGTT TTTTCGGGGC CTTTTAGTT GGCTAACTGA CCTGGAAAGA 950
 AAAAGCAATA ACCTCAAAGT GACTATTTCAG TTTTCAGGAT GATACACTAT 1000
 GAAGATGTTT CAAAAATCT GACCAAAACA AACAAACAGA AA 1042

(2) TUDNIVALÓK A 4. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 281 aminosav
- (B) TÍPUS: PRT
- (D) LÁNC: Lineáris

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 4. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Met	Ala	Met	Met	Glu	Val	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr
1					5				10					15
Cys	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys
				20					25					30
Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Val	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Met
				35					40					45

Gln	Asp	Lys	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu
				50					55					60
Asp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Asp	Pro	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	Met	Asn	Ser
				65					70					75
Pro	Cys	Trp	Gln	Val	Lys	Trp	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Arg	Lys
				80					85					90
Met	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Glu
				95					100					105
Lys	Gln	Gln	Asn	Ile	Ser	Pro	Leu	Val	Arg	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln
				110					115					120
Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr
				125					130					135
Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys
				140					145					150
Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser
				155					160					165
Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	His	Gln	Lys	Gly
				170					175					180
Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu
				185					190					195
Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile
				200					205					210
Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser
				215					220					225
Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr
				230					235					240
Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg
				245					250					255
Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His
				260					265					270
Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly				
				275					280					

(2) TUDNIVALÓK AZ 5. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 212 aminosav
- (B) TÍPUS: FRT
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia

(B) ELHELYEZKEDÉS: 1-212

(C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:

(D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia.

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 5. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	20	25	30	
Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	35	40	45	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	65	70	75	
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	80	85	90	
Thr	Leu	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	95	100	105	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	110	115	120	
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	125	130	135	
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	140	145	150	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	155	160	165	
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	170	175	180	
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	185	190	195	
His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	200	205	210	
Glu	Cys																	

(2) TUDNIVALÓK A 6. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(1) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 43 bázispár

(B) TÍPUS: DNS

(C) SZÁL: Egyszálú

(D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-43
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia.

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 6. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

AGCTTGTCGG GGAGCGCCAT CACCATCACC ATCACTAAGC ATG 43

(2) TUDNIVALÓK A 7. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 35 bázispár
- (B) TÍPUS: DNS
- (C) SZÁL: Egyszálú
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-35
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 7. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

CTTAGTCATG GTGATGGTGA TGGCGCTCCC CGACA 35

(2) TUDNIVALÓK A 8. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 43 bázispár
- (B) TÍPUS: DNS
- (C) SZÁL: Egyszálú
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-43
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia.

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 8. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

AGCTTGTCGG GGAGCGCAAA AAGAAAAAGA AAAAGTAAGC ATG 43

(2) TUDNIVALÓK A 9. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 35 bázispár
- (B) TÍPUS: DNS
- (C) SZÁL: Egyszálú
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-35
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia.

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 9. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

CTTACTTTTT CTTTTCTTT TTGCGCTCCC CGACA 35

(2) TUDNIVALÓK A 10. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ:

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 12 amino acids
- (B) TÍPUS: PRT
- (D) LÁNC: Lineáris

(ix) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁG:

- (A) NÉV/KULCS: Mesterséges szekvencia
- (B) ELHELYEZKEDÉS: 1-12
- (C) AZONOSÍTÁSI MÓDSZER:
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Szintetizált szekvencia.

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 10. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
1				5					10		

Szabadalmi igénypontok

1. *E. coli* törzs, amely a DegP-proteázt kódoló kromoszómális degP-gén, illetve a Prc-proteázt kódoló kromoszómális prc-gén vonatkozásában deficiens, és mutáns spr-gént hordoz, amelynek terméke szuppresszálja a prc-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusát.
2. Az 1. igénypont szerinti törzs, amely a proteáz-III-at kódoló kromoszómális ptr3-gén vagy az OmpT-proteázt kódoló kromoszómális ompT-gén vonatkozásában nem deficiens.
3. Az 1. igénypont szerinti törzs, amely a törzs szempontjából heterológ polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.
4. A 3. igénypont szerinti törzs, amely proteolízisre érzékeny polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.
5. A 3. igénypont szerinti törzs, amely eukarióta polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.
6. Az 5. igénypont szerinti törzs, amely emlőseredetű polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz.
7. A 3. igénypont szerinti törzs, amely a nukleinsavval transzformálva van.

8. Eljárás polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy (a) olyan *E. coli* törzset tenyésztünk, amely a *Pro*-*proteázt* kódoló kromoszómális *prc*-gén vonatkozásában deficiens, és mutáns *spr*-gént hordoz, melynek terméke szuppresszálja a *prc*-mutánsokat hordozó törzsek sejtszaporodási fenotípusát, és amely *E. coli* törzs a termeltetni kívánt - a törzse nézve heterológ - polipeptidet kódoló nukleinsavat tartalmaz, és a tenyésztést oly módon végezzük, hogy bekövetkezzen a nukleinsav expressziója; és (b) a törzsből kinyerjük a heterológ polipeptidet.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy heterológ polipeptidként proteolízisre érzékeny polipeptidet termeltetünk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tenyésztést fermentorban hajtjuk végre.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tenyésztést nagy sejtsűrűségű fermentációs feltételek mellett végezzük.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tenyésztést kis sejtsűrűségű fermentációs feltételek mellett végezzük.

13. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptidet a sejtek periplazmájából vagy tenyésztő

tápközegéből nyerjük ki.

14. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polipeptidként antitestet vagy Apo2-ligandumot termeltetünk.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polipeptidként antitestet termeltetünk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként humanizált antitestet termeltetünk.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként teljes hosszúságú antitestet termeltetünk.

18. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként CD18 elleni, VEGF elleni, szöveti faktor elleni, 2C4-, anti-Her2, anti-CD20, anti-CD40 vagy anti-CD11a antitestet termeltetünk.

19. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitestként antitest-fragmenst termeltetünk.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antitest-fragmensként egy antitest könnyű láncát termeltetjük.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy könnyű láncként kappa könnyű láncot termeltetünk.

22. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitest-fragmensként Fab-fragmenst, Fab'-fragmenst, Fab'2-fragmenst vagy Fab'2/leucin-cipzár fúziós molekulát termeltetünk.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitest-fragmensként anti-CD18 Fab'2/leucin-cipzár fúziós molekulát, szöveti faktor elleni Fab'2/leucin-cipzár fúziós molekulát vagy anti-VEGF Fab-fragmenst (hisztidin- vagy lizin-toldalékkal vagy anélkül) termeltetünk.

24. A 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitest-fragmensként anti-CD18 Fab'2/leucin-cipzár fúziós molekulát, szöveti faktor elleni Fab'2/leucin-cipzár/6xHis fúziós molekulát, anti-VEGF Fab-fragmenst, anti-CD18 Fab'2/leucin-cipzár/6xHis fúziós molekulát vagy anti-CD18 Fab'2/leucin-cipzár/6xLys fúziós molekulát termeltetünk.

A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VEDŐJY IRODA
KARÁCSONYI BELA
szabadalmi ügyvéd

13/1

1 GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAGAATC TCATTGCTGA
61 GTTGTATATTT AAGCTTTTGA GATTATCGTC ACTGCAATGC TTGCGARTAT GCGGCAAAAT
121 GACCAACAGC GGTGTATGA TCAGGTAGAG GGGGCGCTGT ACGAGGTAAA GCGCGATGCC
181 AGCATTCCTG ACGACGATAC GGAGCTGCTG CCGGATTACG TAAAGAAATTT ATTGAAGCAT
241 CCTCGTCAGT AAAAAGTTAA TCITTTTCAAC AGCTGTCATA AAGTGTGTCAC GCGCGAGACT
301 TATAGTCGCT TTGTTTTTAT TTTTAAATGT ATTTGTAAT AGAATTCGAG CTCGGTACCC
341 GGGGATCCTC TAGAGGTGA GGTGATTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT
-23 M K K N I A F L

1/A ÁBRA

414 CTT GCA TCT ATG TTC GPT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAT ATC
-15 L A S M F V F S I A T N A Y A D I
465 CAG TTG ACC CAG TCC CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT AGG GTC
2 Q L T Q S P S S L S A S V G D R V
516 ACC ATC ACC TGC AGC GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAC TAT TTA AAC TGG TAT
19 T I T C S A S Q D I S N Y L N W Y
567 CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA GTA CTG ATT TAC TTC ACC TCC TCT
36 Q Q K P G K A P K V L I Y F T S S
618 CTC CAC TCT GGA GTC CCT TCT CCG TTC TCT GGA TCC GGT TCT GCG ACG GAT
53 L H S G V P S R F S G S G S G T D
669 TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAG CCA GAA GAC TTC GCA ACT TAT TAC
70 F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
720 TGT CAA CAG TAT AGC ACC GTG CCG TGG ACG TTT GGA CAG GGT ACC AAG GTC
87 C Q Q Y S T V P W T F G Q G T K V

1/B ÁBRA

771 GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
104 E I K R T V A A P S V F I F P P S
822 GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCT TCT GPT GTG TGC CTG CTG AAT AAC
121 D E Q L K S G T A S V V C L L N N
873 TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA
138 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
924 TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC
155 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T
975 TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC
172 Y S L S S T L T L S K A D Y E K H
1026 AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCG GTC ACC
189 K V Y A C E V T H Q G L S S P V T
1077 AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA GCTGATC CTCTACGCCG
206 K S F N R G E C

1121 GACGCATCGT GGCCCTAGTA CGCAACTAGT CGTAAAGAGG GTATCTGAG GYTAGGTTA

1/C ÁBRA

13/2

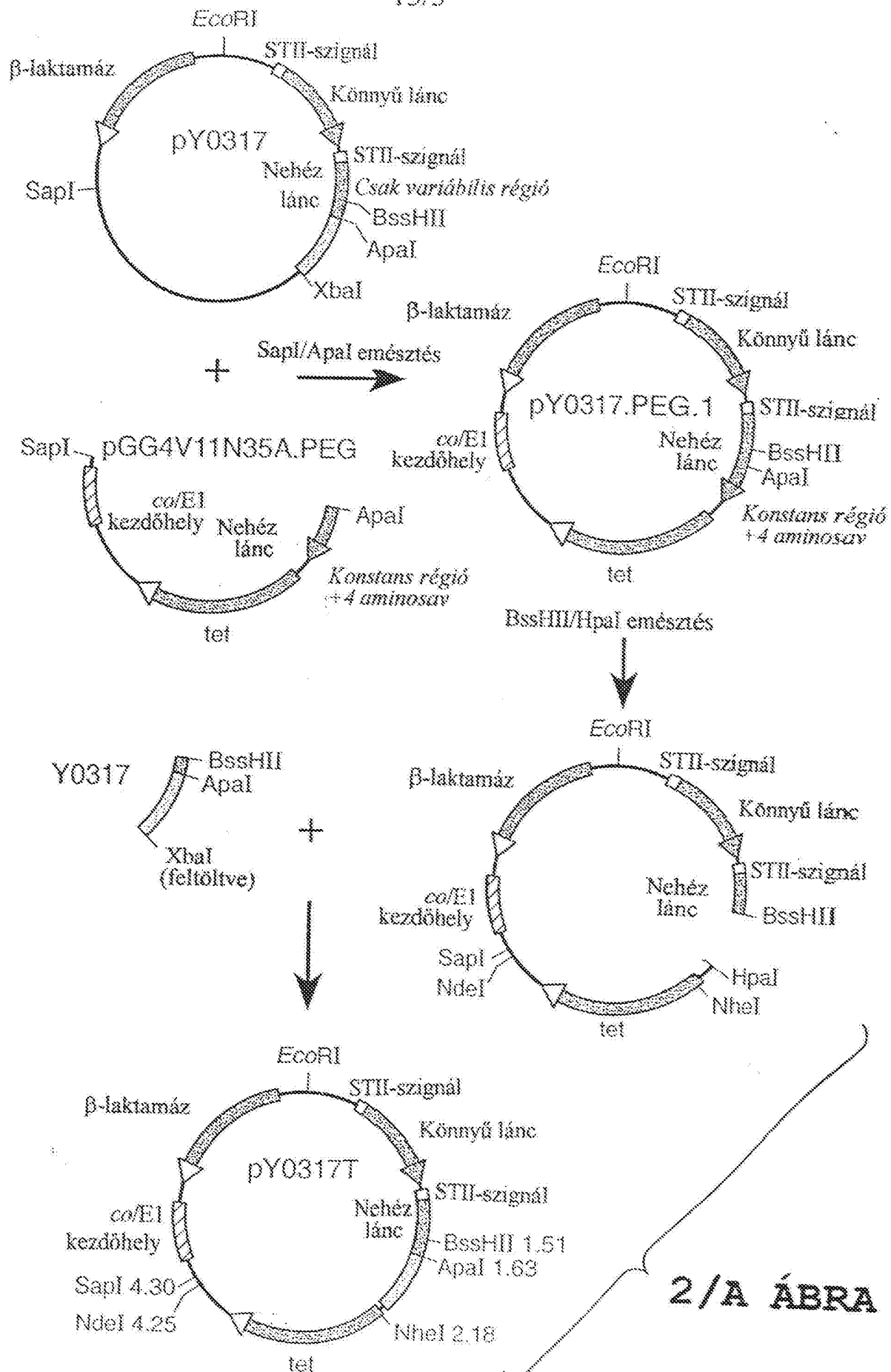
1181 TTTT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC TTT
 -23 M K K N I A F L L A S H F T
 1227 TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT
 -9 F S I A T N A Y A E V Q L V E S
 1275 GGC GGT GGC CTG GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA
 8 G G G L V Q P G G S L R L S C A
 1323 GCT TCT GGC TAC GAC TTC ACG CAC TAC GGT ATG AAC TGG GTC CGT CAG
 24 A S G Y D F T H Y G M N W V R Q
 1371 GCC CCG GGT AAG GGC CTG GAA TGG GTT GGA TGG ATT AAC ACC TAT ACC
 40 A P G K G L E W V G W I N T Y T
 1419 GGT GAA CCG ACT TAT GCT GCG GAT TTC AAA CGT CGT TTC ACT TTT TCT
 56 G E P T Y A A D F K R R F T E S
 1457 TTA GAC ACC TCC AAA AGC ACA GCA TAC CTG CAG ATG AAC AGC CTG CGC
 72 L D T S K S T A Y L Q M N S L E
 1515 GCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCA AAG TAC CCG TAC TAT TAT
 88 A E D T A V Y Y C A K Y P Y Y Y
 1563 GGC ACG AGC CAC TGG TAT TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC
 104 G T S H W Y F D V W G Q G T L V

1/D ÁBRA

1611 ACC GTC TCC TCG GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA
 120 T V S S A S T K G P S V F P L A
 1659 CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG
 136 P S S K S T S G G T A A L G C L
 1707 GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTC TCG TGG AAC TCA GGC
 152 V K D Y F P E P V T V S W N S G
 1755 GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
 168 A L T S G V H T F P A V L Q S S
 1803 GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
 184 G L V S L S S V V T V P S S S L
 1851 GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC
 200 G T Q T Y I C N V N H K P S N T
 1899 AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC CTC
 216 K V D K K V E P K S C D K T H L
 1947 TAG AA

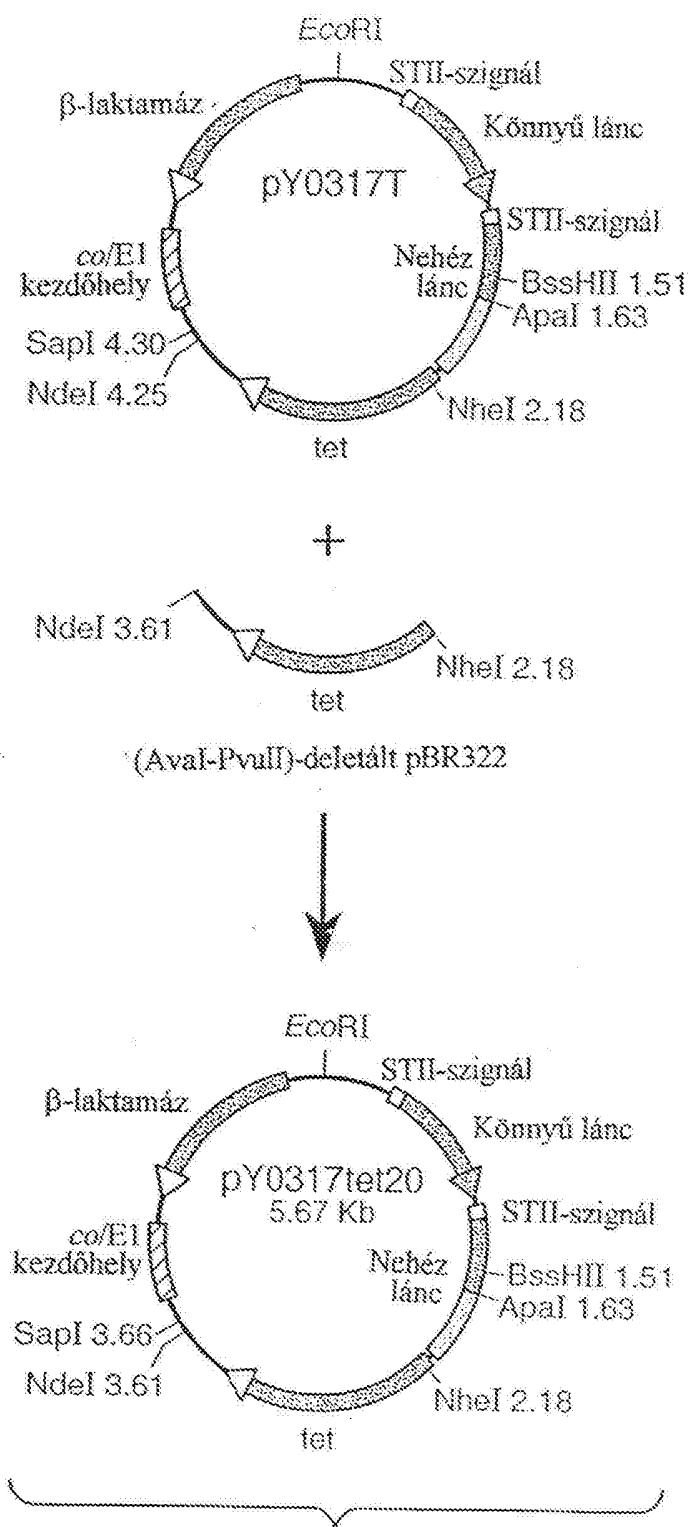
1/E ÁBRA

13/3



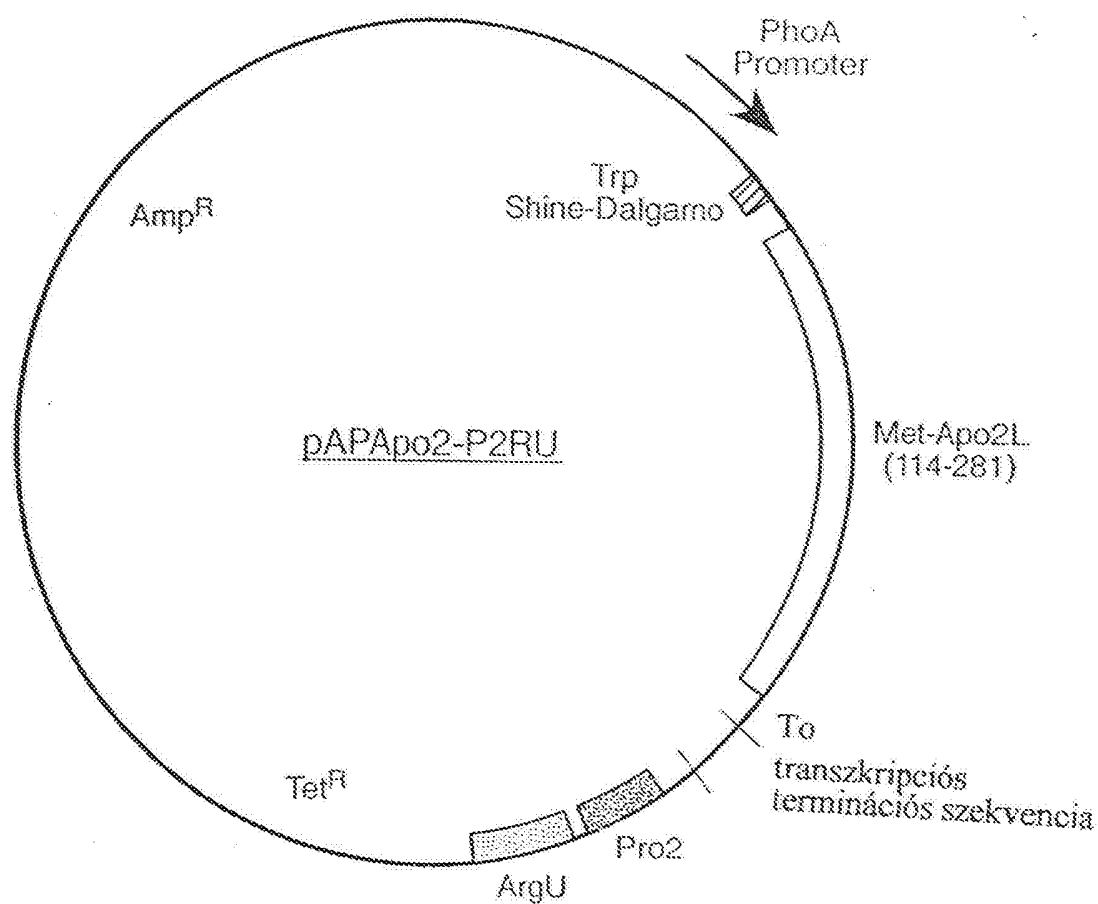
2/A ÁBRA

13/4



2/B ÁBRA

13/5



3. ÁBRA

+

13/6

1 TTTCCTCACTGACTATATAAAGCAATAGACAAAGCAAGCGCTTCAGTGACCGGCTGCTGCTGCTACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGCGGGGACCCAGCCCTGGGACAGACACCTGGCTGCTGATCGTGTATCTTACACAGTCTCTCTGCTCTCTCTGT
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
 181 GTGGCTGTAACCTTACGTCTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATCCAGGACAAAGTACTCCAAAAGTGGCATTCCTGTTCTTAAAGAA
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAAGACAGATATGAACAGCCCTCTGCGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCCTTAGAAAAAG
 61 AspAspSerTyrTyrPaspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
 261 ATGATTTTGAGAACCTCTCGAGGAACCATTTCTACAGTTCAAGAAAGCAACAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAGAGGTCCNCAG
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAAAGTGGGACCAAGAGAAAGCAACACATTCCTCTCCAAAACCTCCAAAGAAATGAAGAGGCTCTGGGCCCCAAA
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
 541 ATAAACTCCTGGGAATCATCAGGAGTGGGCAATTCATTCCTGAGCAACTTCGACCTTGAGGAATGGTGAACCTGGTCATCCATGAAAAAGGG
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGlyLysGly
 631 TTTTACTACATCTATTCCCAACATACTTTCCGATTTCAGGAGGAAATATAAGAAAAACACAAAGAACGACAAACAAATGGTCCCAATATATT
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
 721 TACAAATACACAAAGTTATCTGACCCCTATATTGTTGATCAAAAGCTCCTAGAAAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAAATATCGACTCTAT
 211 TrpLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
 811 TCCATCTATCAAGCGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTCTGTTCTGTAACAAAATGACCACTTGATAGACATGGACCAT
 241 SerIleTyrGlnGlyGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
 901 GAAGCCAGTTTTCGGGGCTTTTATTAGTTGGCTAACTGACCTCGAAAGAAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTCAGGAT
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
 981 CATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAATCTGACCAAAAACAAAACAGAAA

4. ÁBRA

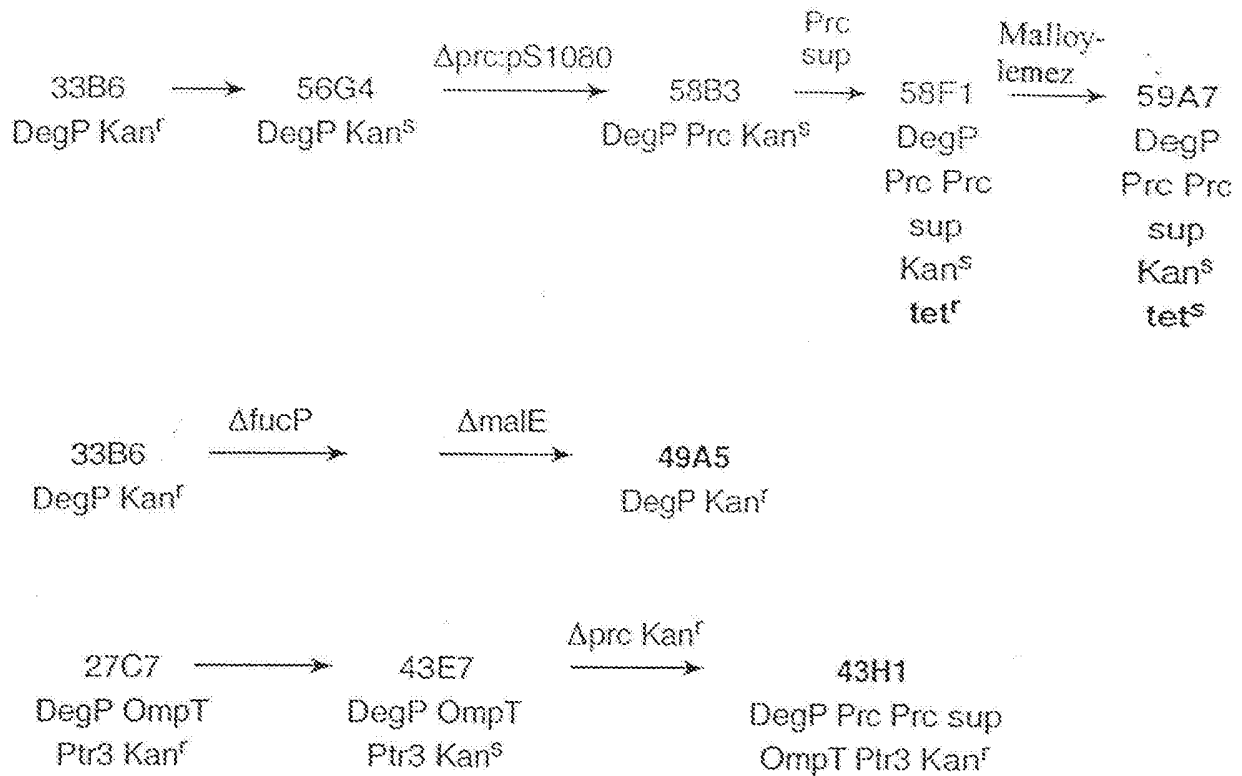
ADVOPATENT

BRADALAI EK VEDNIGYIRODA

VILKONTS

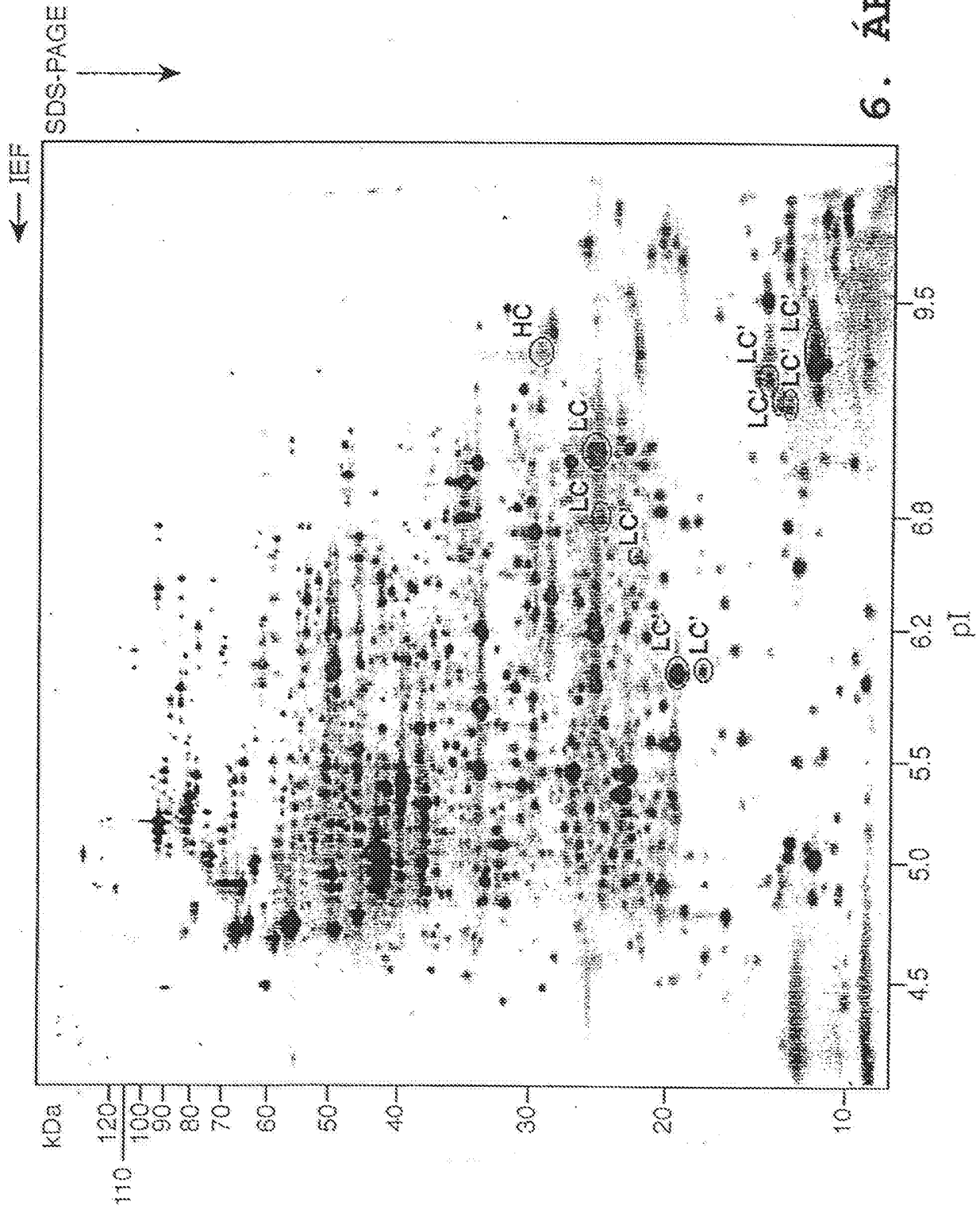
székhely: 1051 Budapest, Váci út 115.

13/7



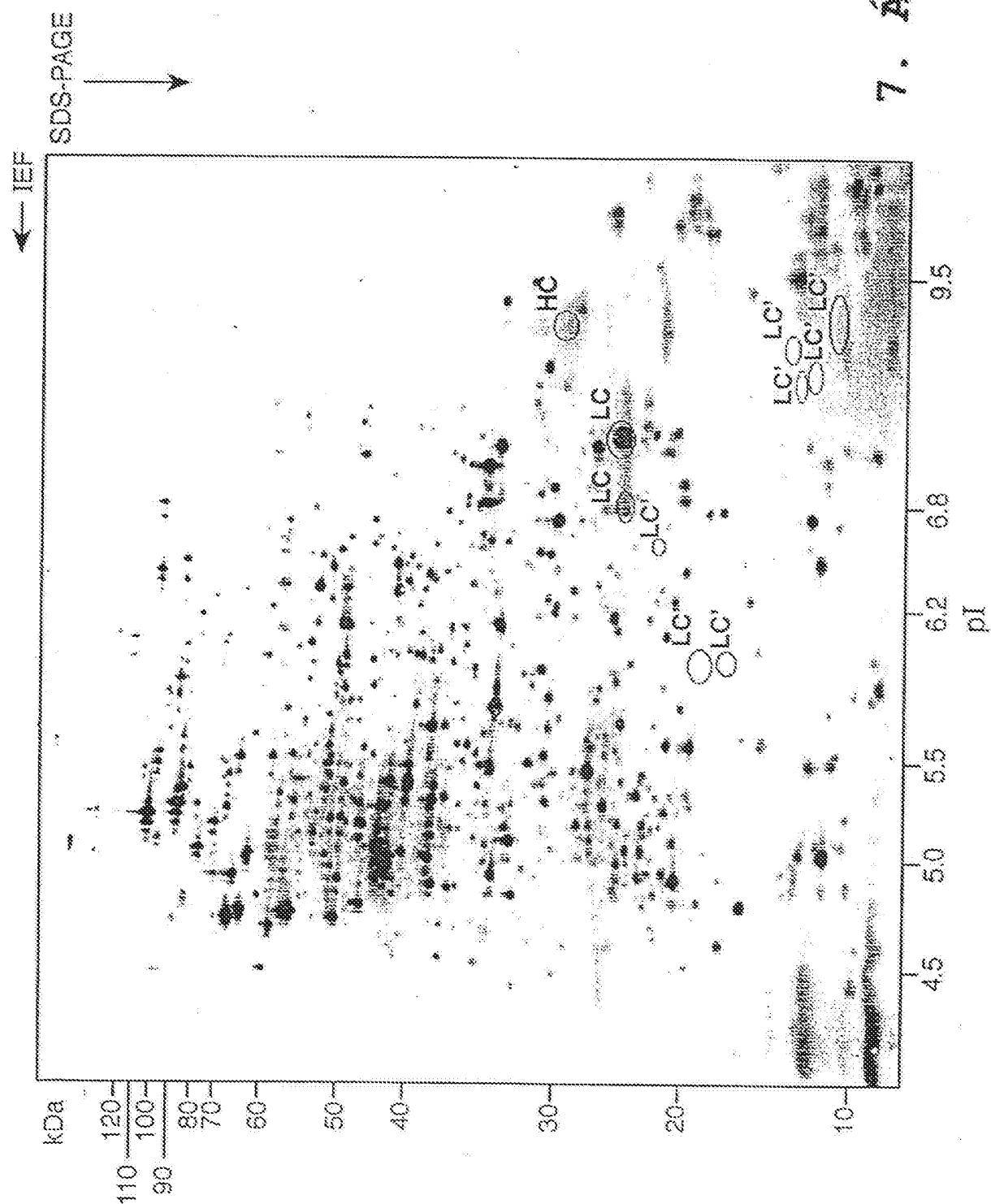
5. ÁBRA

13/8

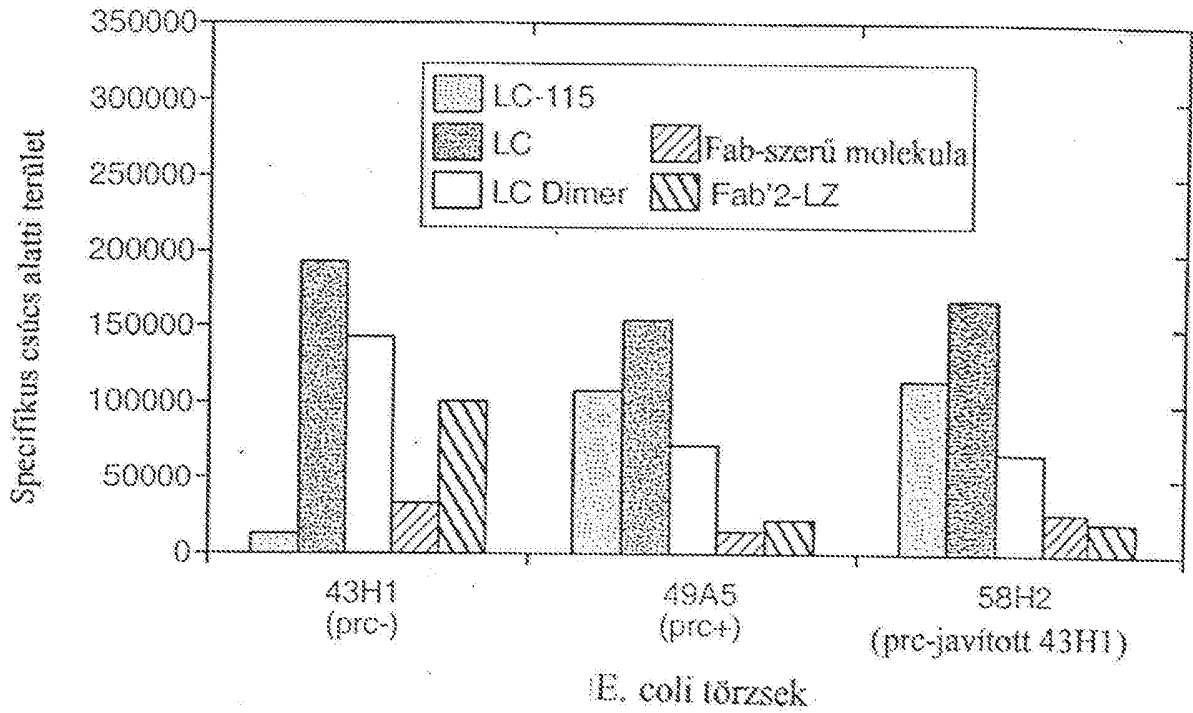


6. ÁBRA

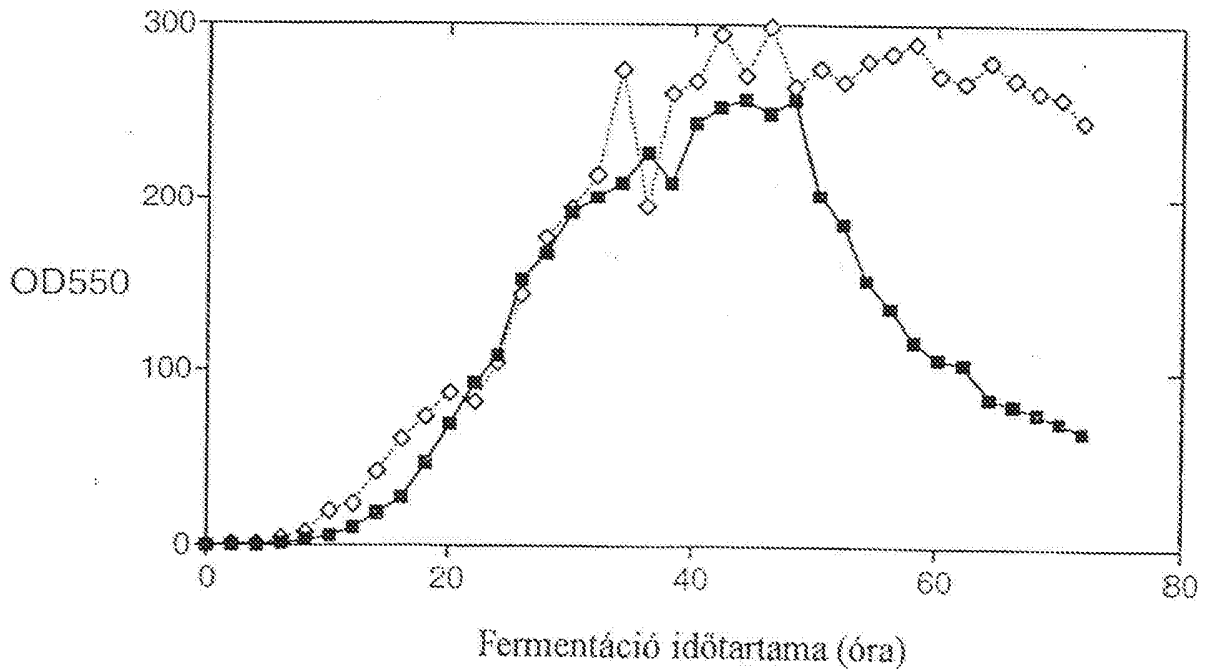
7. ÁBRA



13/10



8. ÁBRA



9. ÁBRA

13/11

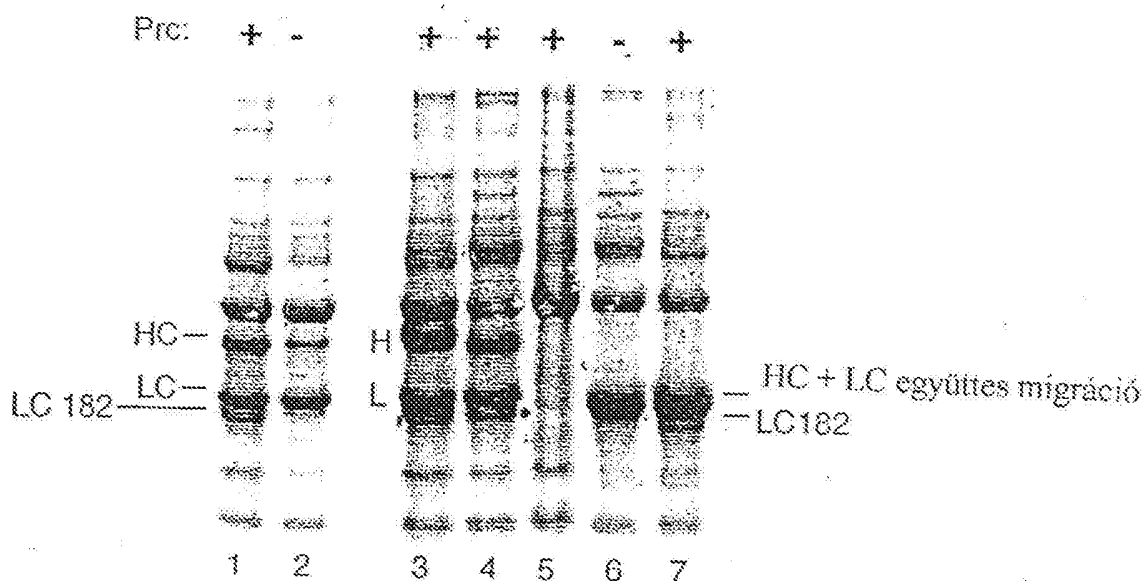
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQOKPGKAPKLLIYYTSHS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPPTFGQGTKVEIKRT

V/AAPS/V/FIFPPSDEQLKSGTA/SVV/CLLNNFYPREA/KV/QWKV/DNA/LQSG
9.14 9.14 8.54 8.54 8.36 8.87 9.17 8.86

NSQESV/TEQDS/KDSTYLSSTLTLSKA/DYEKHKV/YACEV/THQGLSSPV/
8.35 5.97 7.25 7.4 6.48 6.72

TKSE NRGE

10. ÁBRA



11. ÁBRA

+

13/12

12. ÁBRA

