

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2023 552**
(22) Paraiškos padavimo data: **2023-12-19**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2024-06-25**
(30) Prioritetas: **GB2219698.4, 2022-12-23, GB**
GB2312393.8, 2023-08-14, GB
GB2312385.4, 2023-08-14, GB

(71) Pareiškėjas:
UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, V. A.
Graičiūno g. 8, 02241 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
Juozas ŠIURKUS, LT
Dmitrij BUGAJEV, LT
Kristina PAGARAUSKAITĖ, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Otilija KLIMAITIENĖ, 35, AAA Law, A. Goštauto g.
40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Ląstelių auginimo būdas

(57) Referatas:

Pagal šį išradimą yra pateiktas nuskaidrintos ląstelių kultūros, apimančios rekombinantinį baltymą, gamybos būdas, kur metodas apima: i) bioreaktoriaus inokuliavimą ląstelių šeimininke tam, kad būtų gauta ląstelių kultūra, kur minėta ląstelė šeimininkė yra *Escherichia coli*, transformuota raiškos sistema, apimančia: a) nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi; ir b) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi; ii) ląstelių kultūros fermentavimą, esant tokioms sąlygoms, kurios: a) suteikia galimybę ekspresuoti rekombinantinį polipeptidą; ir b) suteikia galimybę prasiskverbti į ląstelę taip, kad susidarytų sferoplastas, išskiriantis rekombinantinį polipeptidą; iii) nuskaidrinimą fermentuotos ląstelių kultūros, apimančios išskiriamą rekombinantinį baltymą, kur minėtas nuskaidrinimas apima pirminio nuskaidrinimo etapą, naudojant pirmąjį nuskaidrinimo filtrą, kurio porų dydis užtikrina bent apie 0,4 µm arba didesnes sulaikymo ribas, kur nuskaidrinimo etapas neapima centrifugavimo.

LĄSTELIŲ AUGINIMO BŪDAS

Šis išradimas yra susijęs su sistema, skirta ekspresuoti rekombinantinius baltymus panaudojant *E. coli*.

Technikos lygis

Escherichia coli yra dažnai pasirenkamas mikroorganizmas rekombinantiniams baltymams gaminti. Pagrindinės šio populiarumo priežastys yra dideli augimo tempai ir raiškos lygis, taip pat reikalingos paprastos ir nebrangios auginimo terpės. Tačiau *E. coli* yra prastai sekretuoja baltymus, o viduląstelių baltymų gamybos metodai, kuriuose naudojami *E. coli*, reikalauja ląstelių ardymo ir ląstelių nuolaužų pašalinimo. Priešingai, užląstelinė rekombinantinių baltymų ir fermentų gamyba labai sumažina bioproceso gamybos metodo sudėtingumą ir pagerina rekombinantinio produkto kokybę, kartu supaprastina baltymų aptikimą ir gryninimą. Be to, buvo įrodyta, kad aplinka, kurioje nėra su ląstelėmis susijusio proteolitinio skilimo, sukuria optimalią aplinką baltymų erdvinių struktūrų susidarymui.

Siekiant palengvinti viduląstelių baltymų gamybą iš *E. coli*, gali būti naudojamos įvairios technologijos. Paprastai pradiniai šių metodų etapai apima bakterijų ląstelių lizavimą arba suardymą tam, kad būtų suardyta bakterijų ląstelių sienelė ir viduląsteliniai baltymai galėtų išsiskirti į užląstelinę aplinką. Po šio atpalaidavimo reikalingi baltymai yra išgryninami iš ekstraktų, įprastai atliekant kelis chromatografijos etapus.

Įrodyta, kad keli metodai yra naudotini siekiant išlaisvinti viduląstelinius baltymus iš bakterijų ląstelių. Tarp jų yra cheminės lizės naudojimas, fiziniai ardymo metodai arba cheminių ir fizinių metodų derinys (Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982)).

Cheminiai bakterijų ląstelių sienelių ardymo metodai, kurie pasirodė tinkami, apima ląstelių apdorojimą organiniais tirpikliais, tokiais kaip toluenas, (Putnam, S. L., and Koch, A. L., Anal. Biochem. 63:350-360 (1975); Laurent, S. J., and Vannier, F. S., Biochimie 59:747-750 (1977); Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982)), chaotropais, tokiais kaip guanidino druskos (Hettwer, D., and Wang, H., Biotechnol. Bioeng. 33:886-895 (1989)), antibiotikais, tokiais kaip polimiksinas B (Schupp, J. M., et al., BioTechniques 19:18-20 (1995); Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982)), arba fermentais, tokiais kaip

lizocimas arba lizostafinas (McHenty, C. S., and Kornberg, A., J. Biol. Chem. 252(18):6478-6484 (1977); Cull, M., and McHenry, C. S., Meth. Enzymol. 182:147- 153 (1990); Hughes, A. J., Jr., et al., J. Cell Biochem. Suppl. 016 (Part B):84 (1992); Sambrook, J., et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), pp. 17- 38; Ausubel, F. M., et al., in Current Protocols in Molecular Biology, New York: John Wiley & Sons (1993), pp. 4.4.1-4.47). Šių įvairių cheminių medžiagų poveikį galima sustiprinti tuo pačiu metu apdorojant bakterijų ląsteles detergentais, tokiais kaip Triton X-100®, natrio dodecilsulfatas (SDS) arba Brij 35 (Laurent, S. J., and Vannier, F. S., Biochimie 59:747-750 (1977); Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982); Hettwer, D., and Wang, H., Biotechnol. Bioeng, 33:886-895 (1989); Cull, M., and McHenry, C. S., Meth. Enzymol. 182:147-153 (1990); Schupp, J. M., et al., BioTechniques 19:18-20 (1995)), arba baltymais ar protaminais, tokiais kaip jaučio serumo albuminas ar spermidinas (McHenry, C. H. and Kornberg, A., J. Biol. Chem. 252(18): 6478-6484 (1977); Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982); Hughes, A. J., Jr., et al., J. Cell Biochem. Suppl. 0 16 (Part B):84 (1992)).

Be šių įvairių cheminių apdorojimo būdų, buvo naudojami keli fiziniai ardymo metodai. Šie fiziniai metodai apima osmozinį šoką, pvz., ląstelių suspensiją hipotoniniame tirpale, kai yra arba nėra emulsiklių (Roberts, J. D., and Lieberman, M. W., Biochemistry 18:4499-4505 (1979); Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982)), džiovinimą (Mowshowitz, D. B., Anal. Biochem. 70:94-99 (1976)), maišymą su granulėmis, tokį kaip malimą rutuliniame malūne (Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982); Cull, M., and McHenry, C. S., Meth. Enzymol. 182:182:147-153 (1990)), temperatūrinį šoką, pvz., sušaldymo-atšildymo ciklai (Lazzarini, R. A., and Johnson L. D., Nature New Biol. 243:17-20 (1975); Felix, H., Anal. Biochem. 120:211-234 (1982)), apdorojimą ultragarsu (Amos, H., et al., J. Bacteriol. 94:232-240 (1967); Ausubel, F. M., et al., in Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons (1993), pp. 4.4.1-4.47) suardymą slėgiu, pvz., panaudojant prancūziško preso slėgio kamerą (Ausubel, F. M., et al., in Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons (1993), pp. 16.8.6-16.8.8). Kiti metodai apjungia šiuos cheminius ir fizinius suardymo metodus, pvz., apdorojimą lizocimu, po kurio atliekamas apdorojimas ultragarsu arba slėgiu, siekiant maksimaliai padidinti ląstelių ardymą ir baltymų išsiskyrimą (Ausubel, F. M., et al., in Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons (1993), pp. 4.4.1-4.47).

Šie suardymo metodai turi keletą privalumų, įskaitant jų gebėjimą greitai ir visiškai suardyti bakterijų ląsteles taip, kad būtų maksimaliai padidintas viduląstelinių baltymų išsiskyrimas.

Tačiau šie metodai taip pat turi ryškių trūkumų. Pavyzdžiui, fiziniai metodai iš esmės apima bakterijų ląstelių sienelių ir plazmos membranų suplėšymą ir suskaidymą. Dėl šių procesų gaunami ekstraktai, kuriuose yra daug kietųjų dalelių, tokių kaip membranos arba ląstelės sienelės fragmentai, kurie turi būti pašalinti iš ekstraktų, įprastai centrifuguojant, prieš išgryninant rekombinantinius baltymus. Šis centrifugavimo poreikis apriboja serijos, kurią galima apdoroti vienu kartu, dydį iki turimos centrifugos tūrio dydžio; taigi, didelio gamybos masto preparatai yra neįgyvendinami, o gal net neįmanomi. Be to, fiziniai metodai ir daugelis cheminių metodų įprastai lemia ne tik norimų viduląstelinių baltymų, bet ir nepageidaujamų nukleorūgščių bei membraninių lipidų išsiskyrimą iš ląstelių (pastarųjų ypač atsiranda naudojant organinius tirpiklius). Šie nepageidaujami ląstelių komponentai taip pat apsunkina tolesnius pageidaujamų baltymų gryninimo procesus, nes padidina ekstraktų klampumą (Sambrook, J., et al., in: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), pp 17-38; Cull, M., and McHenry, C. S., *Meth. Enzymol.* 182:147- 153 (1990)) ir su dideliu aidiškumu bei giminingumu jungiasi prie nukleorūgštis modifikuojančių baltymų, tokių kaip DNR polimerazės, RNR polimerazės ir restrikcijos fermentai.

Natūraliai atsirandantys lizuojantys ir nuosaikieji bakteriofagai turi galimybę išprovokuoti šeimininko ląstelių lizę, ekspresuodami specifinius baltymus lizinio ciklo metu. Šie liziuojantys baltymai buvo nustatyti ir plačiai ištirti, pavyzdžiui, T4 ir T7 bakteriofaguose. Lizuojantys baltymai apima ir holinus, ir lizocimus. Holinai suformuoja stabilius ir nespecifinius citoplazminės membranos pažeidimus, kurie suteikia galimybę lizocimams patekti į peptidoglikano sluoksnį. Lizocimai pasižymi muraliziniu aktyvumu prieš tris skirtingus ląstelės sienelės peptidoglikano polimero kovalentinių ryšių tipus (glikozidinius, amidinius ir peptidinius). Kartu holino ir lizocimo aktyvumas suardo dvi gramneigiamų bakterijų ląstelių membranas ir taip sukelia ląstelių lizę.

E. coli buvo sukonstruota taip, kad ekspresuotų T4 bakteriofago lizinius baltymus tam, kad būtų užtikrinta užprogramuota ląstelių lizė, siekiant pagerinti rekombinantinių baltymų

gamybos tolesnio apdorojimo efektyvumą ir ekonomiškumą (M. Morita, K. Asami, Y. Tanji, and H. Unno, "Programmed *Escherichia coli* Cell Lysis by Expression of Cloned T4 Phage Lysis Genes," Biotechnology Progress , vol. 17, (no. 3), pp. 573-576, 2001).

Konstruktai *Escherichia coli* pagrindu yra auksinis standartas rekombinantinių baltymų gamyboje, kai modifikacijos po transliacijos yra nebūtinės. Pagrindinės *E. coli* populiarumo priežastys yra dideli augimo tempai ir ekspresijos lygiai, taip pat paprastos ir nebrangios auginimo terpės.

Tačiau *E. coli* nėra tobulas šeimininkas, nes jos įprastai neišskiria baltymų į užląstelinę terpę. Taigi viena problema, susijusi su metodais, kuriuose naudojamos *E. coli*, yra ta, kad ląstelių ardymo žingsnis tampa ribojimu ir nėra ekonomiškai efektyvus bandomuoju ar pramoniniu mastu, kai siekiama įgyvendinti uždara ir (arba) nuolatinį proceso vyksmą.

Viena su šiais metodais susijusių problemų yra ta, kad gauti rekombinantiniai baltymai įprastai turi priemaišų. Tai, pavyzdžiui, yra problema gaminant nukleorūgštis modifikuojančius fermentus, nes fermentų preparatai įprastai yra užteršti nukleorūgštimis (pvz., RNR ir DNR). Ši priemaišinė nukleorūgštis gali būti ne tik iš organizmų, kurie yra fermento šaltinis, bet ir iš nežinomų organizmų, esančių reagentuose ir medžiagose, naudojamose fermentui valyti po jo išsiskyrimo iš ląstelių. Tai ypač aktualu atvirkštinės transkriptazės arba DNR polimerazės fermentams, nes jie yra įprastai naudojami nukleorūgščių molekulių amplifikacijos ir sintezės metoduose (pvz., polimerazės grandininėje reakcijoje (PGR), ypač RT-PGR). Tokiame pavyzdyje užterštos DNR arba RNR buvimas fermentų preparatuose yra didelė problema, nes tai gali sukelti klaidingus amplifikacijos arba sintezės rezultatus. Be to, augant fermentų, kaip biokatalizatorių, poreikiui farmacijoje, fermentų preparatų kokybei keliama papildomi reikalavimai, tokie kaip specifiškumas, nuoseklumas pereinant nuo vienos serijos prie kitos, gyvūninės kilmės priemaišų ir antibiotikų nebuvimas, būtinai turi atitikti reguliatorinius reikalavimus.

Taigi, išlieka rekombinantinių baltymų, apimančių *E. coli*, kuriuose iš esmės nėra priemaišų, tokių kaip nukleorūgštys, gamybos metodų poreikis. Šie metodai gali pašalinti užteršimo riziką, pavyzdžiui, iš aplinkos ir personalo, ir įgalinti greitesnį ir lygiagretų gamybos procesą vieno proceso atlikimo vietoje.

Trumpas išradimo aprašymas

Pagal šį išradimą yra pateiktas nuskaidrintos ląstelių kultūros, apimančios rekombinantinį baltymą, gamybos būdas, kur metodas apima:

i) bioreaktoriaus inokuliavimą ląstele šeimininke tam, kad būtų gauta ląstelių kultūra, kur minėta ląstelė šeimininkė yra *Escherichia coli*, transformuota raiškos sistema, apimančia:

a) nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, kur baltymas yra Molonio pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė (MMLV-RT); ir

b) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi;

ii) ląstelių kultūros fermentavimą, esant tokioms sąlygoms, kurios:

a) suteikia galimybę ekspresuoti rekombinantinį polipeptidą; ir

b) suteikia galimybę prasiskverbti į ląstelę taip, kad susidarytų sferoplastas, išskiriantis rekombinantinį polipeptidą;

iii) nuskaidrinimą fermentuotos ląstelių kultūros, apimančios išskiriamą rekombinantinį baltymą, kur minėtas nuskaidrinimas apima:

a) flokuliavimo agento pridėjimą į ląstelių kultūrą, kur flokuliavimo agentas yra polietileniminas (PEI);

b) flokuluotų ląstelių kultūros pirminio nuskaidrinimo etapą, panaudojant pirmąjį nuskaidrinimo filtrą, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai apie 0,4 μm arba didesnes sulaikymo ribas, kur nuskaidrinimo etapas neapima centrifugavimo.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, metodas papildomai apima antrinį nuskaidrinimo etapą, panaudojant antrąjį filtrą, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai apie 0,22 μm sulaikymo ribas.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, pirminiame nuskaidrinimo etape naudojamas pirmasis filtras, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai nuo maždaug 0,4 iki maždaug 0,8 μm sulaikymo ribas.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, antrinio nuskaidrinimo etape naudojamas antrasis filtras, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai nuo maždaug 0,4 iki maždaug 0,8 μm arba mažiausiai nuo maždaug 1,0 iki maždaug 3,0 μm sulaikymo ribas.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, pirminis nuskaidrinimo etapas ir (arba) antrinis nuskaidrinimo etapas yra mikrofiltravimas, pasirinktinai, kur pasirinktinai mikrofiltravimas yra giluminis filtravimas.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, mikrofiltravimas yra pasirenkamas iš normalaus srauto filtravimo (NFF) arba tangentinio srauto filtravimo (TFF).

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, nuskaidrintos ląstelių kultūros drumstumas yra mažesnis nei maždaug 20 NTU.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, procesas atliekamas uždaroje sistemoje taip, kad tarp bioreaktoriaus ir pirmojo bei antrojo nuskaidrinimo filtrų būtų palaikomas sterilus srautas.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, procesas taip pat apima pakopą, kai su minėta nuskaidrinta ląstelių kultūra vykdomos viena arba daugiau iš minėto rekombinantinio baltymo gryninimo pakopų.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, stabilizavimo agentas apima sacharozę, Na_2SO_4 ir Brij 35, pasirinktinai 1 M sacharozę, 0,5 M Na_2SO_4 ir 0,5 % Brij 35.

Šis išradimas taip pat pateikia baltymo gamybos būdą, apimantį:

i) rekombinantinės *Escherichia coli* ląstelės kultivavimą tokiomis sąlygomis, kurios:

a) suteikia galimybę ekspresuoti baltymą; ir

b) suteikia galimybę prasiskverbti į ląstelę taip, kad susidarytų sferoplastas, kuris sekretuoja rekombinantinį polipeptidą; ir

ii) baltymo išskyrimą iš kultūros be visiško rekombinantinės ląstelės lizavimo, kur ląstelė apima raiškos sistemą, apimančią:

a) nukleorūgštį, koduojančią baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, kur baltymas yra Molonio pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė (MMLV-RT); ir

b) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi.

Tinkamu būdu, išradimo metodai neapima: (i) mechaninio ląstelių ardymo; (ii) egzogeninio fermento, kuris ardo ląstelės sienelę, pridėjimo; ir (iii) ląstelės transformavimo raiškos vektoriais, kurių sudėtyje yra nukleorūgštis, koduojanti egzogeninį fermentą, kuris ardo citoplazminę membraną.

Tinkamu būdu, šio išradimo methoduose, nukleorūgštis, koduojanti baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, yra pirmajame konstrukte, o nukleorūgštis, koduojanti T4 lizocimą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, yra antrajame konstrukte.

Tinkamu būdu, šio išradimo methoduose, pirmasis indukuojamas promotorius ir antrasis indukuojamas promotorius yra indukuojami nuosekliai.

Tinkamu būdu, šio išradimo methoduose, pirmasis indukuojamas promotorius ir antrasis indukuojamas promotorius yra indukuojami vienu metu.

Tinkamu būdu, šio išradimo methoduose, pirmasis indukuojamas promotorius yra IPTG indukuojamas promotorius, pasirinktinai kur IPTG indukuojamas promotorius yra PT7.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, antrasis indukuojamas promotorius yra arabinozės indukuojamas promotorius, kur pasirinktinai arabinozės indukuojamas promotorius yra araB.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, T4 lizocimo fermentą koduoja genas E.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, *E. coli* yra *Escherichia coli* JS007 kamienas arba *Escherichia coli* B kamienas.

Tinkamu būdu, šio išradimo metoduose, fermentavimas arba kultivavimas apima temperatūros pakeitimą iš pirmosios temperatūros į antrąją temperatūrą, kur pasirinktinai antroji temperatūra yra žemesnė nei pirmoji temperatūra.

Išradimas taip pat pateikia rekombinantinį baltymą, pagamintą naudojant šio išradimo metodus.

Trumpas brėžinių aprašymas

Išradimo įgyvendinimo variantai toliau aprašomi kartu su nuoroda į pridedamus brėžinius, kuriuose:

1 paveiksle parodytos plazmidžių struktūros: (A) tikslinio geno raiškos vektorius pMuLV-RT-Km, (B) T4 geno *gpe* raiškos vektorius pAra-pelB-gpe.

2 paveiksle parodytas mikroskopinis *E. coli* ląstelių vaizdas prieš ir po *gpe* geno raiškos indukcijos.

3 paveiksle parodyta *E. coli* JS007 pMuLV-RT-Km, pAra-pelB-gpe kultūros augimo optinio tankio kreivė.

4 paveiksle parodyta *E. coli* JS007 pMuLV-RT-Km, pAra-pelB-gpe kultivuojamų ląstelių biomasės ir terpės mėginių 12 % SDS-PAGE gelis: (1) - „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher), (2) – auginimo terpės mėginys prieš tikslinio geno indukciją, (3) – auginimo terpės mėginys praėjus 5 valandoms po tikslinio geno indukcijos 0,1 mM IPTG, (4) – auginimo terpės mėginys praėjus 2 valandoms po lizės geno indukcijos 0,5 g/l L-arabinoze ir praėjus 7 valandoms po tikslinio geno indukcijos 0,1 mM IPTG, (5) -

„PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher), (6) – biomasės mėginys prieš tikslinio geno indukciją; (7) – biomasės mėginys praėjus 5 valandoms po tikslinio geno indukcijos 0,1 mM IPTG, (8) - biomasės mėginys praėjus 2 valandoms po lizės geno indukcijos 0,5 g/l L-arabinoze ir praėjus 7 valandoms po tikslinio geno indukcijos 0,1 mM IPTG.

5 paveiksle pavaizduota MuLV-RT raiška Biostat A.

6 paveiksle pateikta nuskaidrinimo proceso schema, naudojama įvairiems rekombinantiniams baltymams, tokiems kaip MMLV-RT (atvirkštinė transkriptazė), gauti.

Detalus aprašymas

Skaitytojo dėmesys nukreipiamas į visus straipsnius ir dokumentus, kurie yra pateikti kartu su šia specifikacija arba iki jos pateikimo, susijusius su šia paraiška, ir kurie yra atviri visuomenei susipažinti su šia specifikacija, o visų tokių straipsnių ir dokumentų turinys čia įtrauktas kaip nuoroda.

Atitinkamai, išradimas pateikia išgrynintos ląstelių kultūros, apimančios rekombinantinį baltymą, gamybos būdą, kur metodas apima:

i) bioreaktoriaus inokuliavimą ląstele šeimininke tam, kad būtų gauta ląstelių kultūra, kur minėta ląstelė šeimininkė yra *Escherichia coli*, transformuota raiškos sistema, apimančia:

a) nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, kur baltymas yra Molonio pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė (MMLV-RT); ir

b) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi;

ii) ląstelių kultūros fermentavimą, esant tokioms sąlygoms, kurios:

a) suteikia galimybę ekspresuoti rekombinantinį polipeptidą; ir

b) suteikia galimybę prasiskverbti į ląstelę taip, kad susiformuotų sferoplastas, išskiriantis rekombinantinį polipeptidą;

kur minėta fermentavimo pakopa apima stabilizuojančio agento pridėjimą į ląstelių kultūrą;

iii) nuskaidrinimą fermentuotos ląstelių kultūros, apimančios išskiriamą rekombinantinį baltymą, kur minėtas nuskaidrinimas apima:

a) flokuliavimo agento pridėjimą į ląstelių kultūrą, kur flokuliavimo agentas yra polietileniminas (PEI);

b) flokuluotų ląstelių kultūros pirminio nuskaidrinimo etapą, panaudojant pirmąjį nuskaidrinimo filtrą, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai apie 0,4 μm arba didesnes sulaikymo ribas, kur nuskaidrinimo etapas neapima centrifugavimo.

Kaip privalumą išradėjai nustatė, kad rekombinantiniai *E. coli* sferoplastai išskiria baltymą iki ląstelių lizės.

Išradėjai parodė, kad koordinuota nukleorūgštis, koduojančios T4 lizocimą, susieta su pektato liazės B (PelB) sekrecijos signaline seka ekspresija kartu su nukleorūgštis, koduojančios rekombinantinį polipeptidą (pvz., MMuLV-RT), užtikrina labai veiksmingą būdą ekspresuoti didelius rekombinantinio baltymo kiekius, pvz. MMuLV-RT, be reikmės surinkti rekombinantines ląsteles iš fermentacijos kultūros ir vėliau ląsteles lizuoti mechaniniu arba fermentiniu būdu taip, kad būtų atpalaiduotas rekombinantinis baltymas. Tuo atveju, kai T4 fago lizocimo genas yra klonuojamas po griežtai kontroliuojamo promotoriaus, tokio kaip araB, T4 fago lizocimo periplazminis kaupimasis gali būti sužadintas pridedant induktoriaus (pvz., arabinozės) tinkamu fermentacijos proceso metu. T4 fago lizocimo raiška su PelB signaline seka palengvina T4 lizocimo perkėlimą į periplazminę sritį, kur fermentas suardo peptidoglikano sluoksnį, ir dėl to ląstelėje atsiranda morfologinių pokyčių, dėl kurių susidaro sferoplastas.

Rekombinantinis polipeptido genas, pvz., MMuLV-RT genas, yra klonuojamas kontroliuojant indukuojamam promotoriui, tokiame kaip Ptac arba lacUV5, baltymo raiška gali būti indukuojama pridedant induktorių, tokį kaip IPTG, tinkamu fermentacijos proceso momentu. Realizavus rekombinantinio peptido, pvz., MMuLV-RT ir T4 fago lizocimo,

nukleorūgšties ekspresiją taip, kad ji būtų kontroliuojama atskiro promotoriaus, jų ekspresija gali nepriklausomai reguliuoti kiekvieno fermento gamybą fermentacijos metu. Išradėjai parodė, kad T4 lizocimo sukelti sferoplastai išskiria rekombinantinį baltymą, pvz., MMuLV-RT, į kultūros supernatantą, nereikalaudami sekrecijos signalinės sekos. Išradėjai pastebėjo, kad rekombinantinio baltymo, pvz., MMuLV-RT, raiška neturi žalingo poveikio ląstelėi-šeimininkei. Iš tiesų išradėjai parodė, kad indukuoti sferoplastai galėjo *de novo* ekspresuoti rekombinantinį peptidą, pvz., MMuLV-RT, mažiausiai 2 valandas po T4 lizocimo indukcijos. Be to išradėjai pademonstravo, kad gautą fermentuotą ląstelių kultūrą galima sėkmingai nuskaidrinti naudojant nuskaidrinimo filtrą, kurio porų dydis neįprastai didelis, kas užtikrina mažiausiai apie 0,4 μm sulaikymo ribas. Tai buvo visiškai netikėta, nes nustatyti *E.coli* bakterijai rekomenduojami pirminiai nuskaidrinimo metodai pagrįsti tangentiniu srauto filtravimu, panaudojant filtrą, kurio porų dydis $< 0,2 \mu\text{m}$, kartu su centrifugavimu tam, kad būtų pašalintos ląstelių nuolaužos.

Papildomai išradėjai įrodė, kad sferoplastų fermentuotos ląstelių kultūros gali būti efektyviai išvalytos neatliekant centrifugavimo. Atsisakius centrifugavimo pakopos būtinumo, fermentacija ir nuskaidrinimas gali būti vykdomi uždaroje sistemoje, tokiu būdu pašalinant išorinio užteršimo riziką.

Taigi *E. coli*, transformuotų raiškos sistema, kuri sudarė sąlygas ląstelės pralaidumui, kartu su nuskaidrinimo procesu, kuriam nereikalingas centrifugavimas, ne tik sumažina užteršimo riziką baltymų gamybos metu, bet ir papildomai eliminuoja eilę tolesnių apdorojimo būdų gamybos etapuose, įskaitant: ląstelių surinkimą, mechaninį ir (arba) fermentinį ląstelių lizavimą, ląstelių nuolaužų atskyrimą, nukleorūgščių nusodinimą, po kurio vyksta atskyrimas naudojant filtravimą arba centrifugavimą. Taigi apibrėžti metodai užtikrina didelę baltymų išėigą esant dideliame ląstelių tankiui ir padidintam mastui. Be to, eliminavus poreikį lizuoti ląsteles šeimininkes ir susijusius centrifugavimo etapus, sutrumpėja didelio masto apdorojimo laikas nei naudojant įprastus metodus lizavimo pagrindu.

Raiškos sistema

Išradimo būdas naudoja raiškos sistemą. Sistema apima i) nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi; ir ii) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB

sekrecinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi, kur baltymas yra MMuLV-RT.

Čia vartojamas terminas „MMuLV-RT“, „Molonio pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė“ arba „MuLV-RT“ reiškia DNR polimerazę, kuri sintetina komplementarią DNR grandinę nuo viengrandės RNR, DNR arba RNR:DNR hibrido. MMuLV-RT baltymas gali apimti seką SEQ ID Nr. 1.

Čia vartojamas terminas „T4 lizocimas“, „E baltymas“ arba „gpe“ reiškia citoplazminę muramidazę, kuri palengvina T4 fagu užkrėstų bakterijų ląstelių lizę, tokiu būdu atpalaiduojant replikuotas fago daleles (Tsugita and Inouye, J. Mol. Biol., 37: 201-12 (1968); Tsugita and Inouye, J. Biol. Chem., 243: 391-97 (1968), Uniprot accession: D9IEF7), arba mutantą, darinį arba fragmentą, turintį DNR polimerazės aktyvumą. Ją koduoja T4 bakteriofago genas, ir ji hidrolizuoja ryšius tarp N-acetilgliukozamino ir N-acetilmuramo rūgšties liekanų standžiajame *E. coli* ląstelės apvalkalo peptidoglikano sluoksnyje. Fermentas yra vienos polipeptidinės grandinės, kurios molekulinė masė yra 18,3 kDa. Ji yra maždaug 250 kartų aktyvesnė nei HEW-lizocimas bakterinio peptidoglikano atžvilgiu (Matthews et al., J. Mol. Biol., 147: 545-558 (1981)). Optimali pH vertė T4 lizocimo fermento aktyvumui yra 7,3, o HEW-lizocimui – 9 (The Worthington Manual ; pp 219- 221). T4 fermentas gali turėti seką, apibrėžtą NCBI referentinę seką: NP_049736.1. T4 fermentas gali turėti seką SEQ ID Nr. 2.

Čia vartojamas terminas „rekombinantinis“ reiškia baltymus, kurie yra sukonstruoti, paruošti, ekspresuoti, sukurti, pagaminti ir (arba) išskirti rekombinantinėmis priemonėmis, tokiomis kaip, polipeptidai, ekspresuojami naudojant rekombinantinį raiškos vektorius, transfekuotą į ląstelę šeimininkę. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose rekombinantinis baltymas yra funkcinis variantas, gautas iš žinomo MMuLV-RT polipeptido. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose funkcinio varianto polipeptido seka yra mažiausiai 70 %, 75 %, 80 %, 82 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, identiška MMuLV-RT polipeptido sekai SEQ ID Nr. 1. Dviejų sekų tapatumo procentinė dalis priklauso nuo identiškų sekų padėčių skaičiaus, atsižvelgiant į tarpų skaičių ir kiekvieno tarpo ilgį, kurį reikia įvesti tam, kad dvi sekos būtų optimaliai suderintos. Sekų palyginimas ir dviejų sekų tapatumo procentinis nustatymas gali būti

atliktas naudojant matematinį algoritmą. Priimtiname įgyvendinimo variante dviejų aminorūgščių sekų identiškumo procentinės dalis yra nustatoma naudojant (Needleman ir kt. (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) algoritmą, kuris buvo įtrauktas į GAP programą GCG programinės įrangos pakete (galima rasti adresu <http://www.gcg.com>), naudojant BLOSUM 62 matricą arba PAM250 matricą ir tarpo svorį lygų 16, 14, 12, 10, 8, 6 arba 4, o ilgio svorį lygų 1, 2, 3, 4, 5 arba 6. Dar kitame priimtiname įgyvendinimo variante procentinis dviejų nukleotidų sekų tapatumas nustatomas naudojant GAP programą GCG programinės įrangos pakete (galima rasti adresu <http://www.gcg.com>), naudojant NWSgapdna.CMP matricą ir tarpo svorį lygų 40, 50, 60, 70 arba 80, o ilgio svorį lygų 1, 2, 3, 4, 5 arba 6. Ypač pageidautinas parametrų rinkinys (ir tas, kuris turėtų būti naudojamas, jei specialistas nėra tikras, kokius parametrus reikėtų taikyti tam, kad nustatytų, ar molekulė išsitenka išradimo sekos tapatumo arba homologijos apribojimuose) yra BLOSUM 62 balų skaičiavimo matrica su tarpo bauda lygia 12, tarpo išplėtimo bauda 4, ir rėmelio poslinkio tarpo bauda lygia 5. Kaip alternatyvą, dviejų aminorūgščių arba nukleotidų sekų procentinį tapatumą galima nustatyti naudojant algoritmą (Meyers ir kt. (1989) CABIOS 4:11-17)), kuris buvo įtrauktas į ALIGN programą (2.0 versija), naudojant PAM120 svorio liekanos lentelę, tarpo ilgio baudą lygia 12 ir tarpo baudą lygia 4.

Raiškos sistemos, skirtos panaudoti pagal šio išradimo būdą, gali būti suformuotos naudojant metodus, kurie yra gerai žinomi šioje srityje. Apskritai, cDNR arba genominė DNR, koduojanti rekombinantinį baltymą, tokį kaip MMuLV-RT arba T4 lizocimas, yra tinkamai įterpiama į replikuojamą vektorių, skirtą raiškai *E. coli* ląstelėse, kontroliuojant *E. coli* tinkamu promotoriumi. Tinkami vektoriai yra gerai žinomi šioje srityje, o atitinkamo vektoriaus pasirinkimas priklausys nuo nukleorūgšties, kuri bus įterpiama į vektorių, dydžio ir ląstelės šeimininkės, kuri turi būti transformuojama vektoriumi. Kiekvienas vektorius turi įvairių komponentų. Pavyzdžiui, bakterinės transformacijos vektoriai apims rekombinantinio polipeptido signalinę seką ir taip pat rekombinantinio polipeptido promotorių. Pageidautina, kad jie apimtų replikacijos pradžią ir vieną arba daugiau žymeklių genų.

Pageidautina, kad vektoriai būtų gauti iš rūšių, suderinamų su ląstele šeimininke, ir būtų naudojami kartu su bakteriniais šeimininkais, t. y. vektorius, suderinamas su *E. coli*. Pageidautina, kad vektoriuje būtų replikacijos vieta ir žymenys, kurie užtikrintų transformuotų ląstelių fenotipinę atranką. Raiškos vektoriai, skirti naudoti šiame išradime, pageidautina turi

nukleorūgšties seką, kuri leidžia vektoriui replikuotis vienoje arba keliose pasirinktose ląstelėse šeimininkėse. Yra gerai žinomos tokios įvairių bakterijų sekos.

Raiškos vektoriai, skirti naudoti šiame išradime, pageidautina turi atrankos geną arba atrankai skirtą žymenį. Šis genas koduoja baltymą, būtiną transformuotų ląstelių šeimininkų, auginamų selektyvioje auginimo terpėje, išgyvenimui arba augimui. Ląstelės šeimininkės, netransformuotos vektoriumi, bet turinčios atrankos geną, auginimo terpėje neišgyvena. Tipiški atrankos genai koduoja baltymus, kurie (a) suteikia atsparumą antibiotikams arba kitiems toksinams, pvz., ampicilinui, neomicinui, metotreksatui arba tetraciklinui, (b) papildo auksotrofinius trūkumus arba (c) aprūpina svarbiomis maistinėmis medžiagomis, kurių nėra kompleksinėje terpėje.

Raiškos vektoriai, skirti naudoti šiame išradime, turi indukuojamą promotorių, kurį atpažįsta bakterinis organizmas šeimininkas, ir kuris yra funkcionaliai sujungtas su nukleorūgštimi, koduojančia dominantį polipeptidą, t. y. rekombinantinio baltymo, pvz., MMuLV-RT arba T4 lizocimo.

Indukuojami promotoriai, tinkami naudoti su bakterinėmis šeimininkėmis, tokiomis kaip *E. coli*, apima β -laktamazės ir laktozės promotorių sistemas (Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281: 544 (1979)), arabinozės promotorių sistemą, įskaitant araBAD promotorių (Guzman et al., *J. Bacteriol.*, 174: 7716-7728 (1992); Guzman et al., *J. Bacteriol.*, 177: 4121-4130 (1995); Siegele and Hu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 8168-8172 (1997)), ramnozės promotorių (Haldimann et al., *J. Bacteriol.*, 180: 1277-1286 (1998)), šarminės fosfatazės promotorių, triptofano (*trp*) promotoriaus sistemą (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980) ir EP 36,776), PLtetO-1 ir Plac/ara-1 promotorius (Lutz and Bujard, *Nucleic Acids Res.*, 25: 1203-1210 (1997)) ir hibridinius promotorius, tokius kaip tac promotorius (deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)).

Čia vartojamas terminas „indukuojamas promotorius“ reiškia promotorių, kuris, prisijungęs prie transkripcijos faktoriaus, nukreipia transkripciją padidintu arba sumažintu greičiu.

Čia vartojamas terminas „transkripcijos faktorius“ reiškia bet kokius faktorius, kurie gali prisijungti prie promotoriaus reguliavimo arba kontrolės srities ir taip paveikti

transkripciją. Transkripcijos faktoriaus sintezė arba promotorių surišimo gebėjimas ląstelėje šeiminkėje gali būti kontroliuojamas veikiant šeiminkę „induktoriumi“ arba pašalinant „represorių“ iš ląstelės šeiminkės terpės. Atitinkamai, norint reguliuoti indukuojamo promotoriaus raišką, į ląstelės šeiminkės auginimo terpę pridedamas induktorius arba iš jos pašalinamas represorius.

Čia vartojama frazė „sukelti ekspresiją“ arba „indukuoti raišką“ reiškia padidinti transkripciją nuo specifinių genų, veikiant ląsteles, kuriose yra tokių genų, efektoriumi arba induktoriumi.

Čia vartojamas terminas „induktorius“ yra cheminis arba fizinis agentas, kuris, patekęs į ląsteles, padidina transkripciją nuo specifinių genų kiekį. Tai gali būti mažos molekulės, kurių poveikis būdingas tam tikriems operonams arba genų grupėms ir gali apimti cukrų, alkoholį, metalų jonus, hormonus, šilumą, šaltį ir panašiai. Pavyzdžiui, izopropiltio- β -galaktozidas (IPTG) ir laktozė yra lac UV5 promotoriaus induktoriai, o L-arabinozė yra tinkamas arabinozės (araB) promotoriaus induktorius.

Čia vartojamas terminas „indukuojamas promotorius“ yra promotorius, kuris, prisijungęs prie transkripcijos faktoriaus, nukreipia transkripciją padidintu arba sumažintu greičiu.

Čia vartojamas terminas „kontroliuojamas (-a)“ reiškia nukleorūgščių seką, funkcionaliai susietą su kita nukleorūgščių seka. Pavyzdžiui, promotorius arba stipriklis yra funkcionaliai susietas su koduojančia seka, jei tai veikia sekos transkripciją. Tam reikia, kad prijungtos DNR sekos būtų viena greta kitos ir, jei sekreciniai peptidai yra nuskaitymo rėmelyje.

Atitinkamai *E. coli* yra transformuojama naudojant pBR322, plazmidę, gautą iš *E. coli* rūšių. Žiūr. pvz., Bolivar et al., *Gene*, 2: 95 (1977). Plazmidėje pBR322 yra genų, suteikiančių atsparumą ampicilinui ir tetraciklinui tam, kad būtų galima identifikuoti transformuotas ląsteles. Plazmidė pBR322 arba kita mikrobinė plazmidė, arba fagas taip pat įprastai turi arba yra modifikuotas taip, kad jame būtų promotorių, kuriuos bakterinis organizmas gali naudoti atrenkamų žymenų genų raiškai. Išradimo raiškos sistema apima nukleorūgštį,

koduojančią rekombinantinį baltymą, funkcionaliai prijungtą prie pirmojo indukuojamo promotoriaus.

Šio išradimo raiškos sistema taip pat apima nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi.

Čia vartojamas terminas „sekrecinis signalinis peptidas“ arba „signalinis peptidas“ reiškia peptidą, kuris gali būti naudojamas rekombinantiniam polipeptidui išskirti į bakterijos šeimininkės periplazmą. Heterologinio polipeptido signalas gali būti endogeninis bakterijoms arba jis gali būti egzogeninis, įskaitant signalus, būdingus polipeptidui, kurį gamina bakterijos šeimininkės. Paprastai signalinė seka gali būti vektoriaus komponentas arba polipeptidinės DNR, įterptos į vektorių, dalis. Pageidautina, kad vektorius turėtų nukleorūgštį, koduojančią signalinę seką T4 lizocimo baltymo N gale. Pageidautina, kad sekrecinis signalinis peptidas būtų pektato liazė B (PelB). Viename įgyvendinimo variante PelB seka gali būti iš *Erwinia spp.* Atitinkamai, čia atskleista gpe su pelb signaline seka, kuri apima seką SEQ ID Nr. 2. Sekretijos signalinė seka gali būti tiesiogiai susieta su nukleotidų seka, koduojančia rekombinantinį polipeptidą, pvz. MMuLV-RT. Kaip alternatyva, tarp sekretinio signalinio peptido ir nukleotidų sekos, koduojančios rekombinantinį polipeptidą, pvz. MMuLV-RT, gali būti tarpiklis. Tarpiklis gali apimti daugiau arba mažiau nei 9 nukleotidus, antai kaip, pavyzdžiui, nuo 5 iki 20 nukleotidų.

Konstruojant vektorius, turinčius vieną arba daugiau aukščiau aprašytų komponentų, naudojami gerai žinomi ligavimo metodai. DNR fragmentai suskaidomi ir vėl surišami tokia forma, kuri reikalinga tinkamiems vektoriams sukurti.

Patvirtinimą, kad sukonstruotose plazmidėse ir vektoriuose yra teisingos sekos, galima gauti transformuojant *E. coli* K12 kamieną 294 (ATCC 31,446) arba kitus tinkamus kamienus ir atrenkant transformantus pagal atsparumą ampicilinui arba tetraciklinui.

Viename įgyvendinimo variante vektorius ekspresuoja MMuLV-RT, kontroliuojant IPTG indukuojamam Ptac promotoriui arba IPTG indukuojamam lacUV5 promotoriui. Pageidautina, kad vektorius būtų pBR322 vektorius. Viename įgyvendinimo variante

vektorius yra pET29 vektorius. Viename įgyvendinimo variante vektorius yra pMuLV-RT-Km, kaip aprašyta čia.

Viename įgyvendinimo variante vektorius ekspresuoja T4 fago lizocimą, turintį N gale PelB signalinę seką, kontroliuojamą *araB* promotoriaus. Pavyzdžiui, T4 bakteriofago lizocimo genas *gpe* su pelB signaliniu peptidu gali būti klonuojamas į pAra vektorių (Thermo Fisher) su *araB* promotoriumi (plazmidė pAra-pelB-gpe). Plazmidė pAra-pelB-gpe turi replikacijos pradžią, kilusią iš pACYC, ir atsparumo chloramfenikoliui geną, kuris leidžia panaudoti *E. coli* raiškos sistemas, kuriose yra ColE1 tipo plazmidės (1 pav.). Atitinkamai viename įgyvendinimo variante vektorius yra pAra-pelB-gpe. Viename įgyvendinimo variante vektorius yra pAra vektorius. Viename įgyvendinimo variante vektorius yra pBR322 vektorius. Viename įgyvendinimo variante vektorius yra pET29 vektorius. Viename įgyvendinimo variante vektorius yra pLysS-lacI-PcsP-pelB-gpe, kur lacI-PcsP yra šalčiu indukuojamas promotorius *csp* kartu su IPTG indukuojamu operonu lacI. Viename įgyvendinimo variante vektorius yra pACYC184-lacI-Pcsp-PelB-gpe.

Ląstelė šeimininkė

Išradimo metode panaudojama ląstelė šeimininkė, t. y. *E. coli*, transformuota arba transfekuota aukščiau aprašytomis raiškos sistemomis.

Čia vartojamas terminas „transformuotas“ arba „transformacija“ reiškia DNR įvedimą į organizmą taip, kad DNR būtų replikuojama arba kaip ekstrachromosominis elementas, arba kaip chromosominė integracija. Priklausomai nuo naudojamos ląstelės šeimininkės, transformacija yra atliekama naudojant standartinius tokioms ląstelėms tinkamus metodus.

Rekombinantinės ląstelės, skirtos naudoti šio išradimo metoduose, gali būti pagamintos panaudojant rekombinantines DNR technologijas, kurios yra žinomos tos srities specialistui (žiūr. pvz., Kotewicz, M. L., et al., Nucl. Acids Res. 16:265 (1988); Soltis, D. A., and Skalka, A. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3372-3376 (1988)). Tokios rekombinantinės ląstelės gali būti auginamos taikant standartinius mikrobiologinius metodus, panaudojant auginimo terpę ir inkubavimo sąlygas, tinkamas tam tikrų rūšių aktyvioms kultūroms auginti, kurios yra gerai žinomos tos srities specialistui (žiūr. pvz., Brock, T. D., and Freeze, H., J. Bacteriol. 98(1):289-297 (1969); Oshima, T., and Imahori,

K., Int. J. Syst. Bacteriol. 24(1):102-112 (1974)).

Transformacija reiškia DNR įvedimą į organizmą taip, kad DNR būtų replikuojama kaip ekstrachromosominis elementas, arba kaip chromosominė integracija. Priklausomai nuo naudojamos ląstelės šeimininkės, transformacija atliekama naudojant standartinius tokioms ląstelėms tinkamus metodus. Apdorojimas kalciumu naudojant kalcio chloridą, kaip aprašyta Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), įprastai naudojamas bakterijų ląstelėms, kuriose yra esminių ląstelių sienelių barjerų. Kitame transformacijos būde panaudojamas polietileno glikolis/DMSO, kaip aprašyta Chung and Miller, *Nucleic Acids Res.*, 16: 3580 (1988). Dar vienas metodas yra technologijos, vadinamos elektroporacija, panaudojimas.

Čia vartojamos sąvokos „ląstelė“, „ląstelių linija“ ir „ląstelių kultūra“ yra vartojamos pakaitomis, ir visos šios sąvokos apima palikuonis. Taigi, žodžiai „transformantai“ ir „transformuotos ląstelės“ apima pirminę ląstelę ir iš jų gautas kultūras, neatsižvelgiant į pasažų skaičių.

Čia vartojama „*Escherichia coli*“ arba „*E. coli*“ reiškia gramneigiamą, fakultatyvinę anaerobinę lazdelės formos koliforminę *Escherichia* genties bakteriją. *E. coli* kaip šeimininkės kamienai, skirti rekombinantinių DNR produktų fermentacijai, yra gerai žinomi šioje srityje ir apima *E. coli* B (pvz., BL21(DE3) arba jos darinius, *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), *E. coli* 294 (ATCC 31,446) ir *E. coli* X1776 (ATCC 31,537). Šio išradimo metoduose *E. coli* B kamienas arba JS007 kamienas yra tinkamiausias šeimininkas.

Pagal išradimo būdą bakterinės ląstelės gali būti transformuotos vienu arba dviem raiškos vektoriais, turinčiais nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, ir nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą. Vienaime įgyvendinimo variante bakterinės ląstelės yra transformuojamos dviem vektoriais, atitinkamai turinčiais nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, ir nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą. Alternatyviame įgyvendinimo variante nukleorūgštis, koduojanti rekombinantinį baltymą, ir nukleorūgštis, koduojanti T4 lizocimo baltymą, yra viename vektoriuje, kuriuo yra transformuojamos bakterinės ląstelės.

E. coli ląstelės yra transformuojamos aukščiau aprašytu (-ais) šio išradimo raiškos vektoriumi (-iais) ir kultivuojamos įprastose mitybinėse terpėse, modifikuotose taip, kaip būtų tinkamos įvairiems promotoriams indukuoti, jei indukcija vykdoma.

Viename įgyvendinimo variante ląstelė šeimininkė yra *E. coli*, pageidautina *E. coli* B kamienas arba JS007 kamienas, transformuotas vektoriumi, ekspresuojančiu MMuLV-RT, kontroliuojant IPTG indukuojamam PTac arba IPTG indukuojamam lacUV5 promotoriui. Vektorius gali būti bet koks tinkamas vektorius, pvz., pBR322 vektorius.

Viename įgyvendinimo variante ląstelė šeimininkė yra *E. coli*, pageidautina *E. coli* B kamienas, toks kaip BL21(DE3) arba JS007 kamienas, transformuotas vektoriumi, ekspresuojančiu T4 fago lizocimą, turintį N-galinę PelB signalinę seką, kontroliuojamą araB promotoriaus. Vektorius gali būti bet koks tinkamas vektorius toks kaip pBR322 vektorius.

Viename įgyvendinimo variante ląstelė šeimininkė yra *E. coli*, pageidautina *E. coli* B kamienas arba JS007 kamienas, transformuotas vektoriumi, ekspresuojančiu MMuLV-RT, kontroliuojant IPTG indukuojamam promotoriui, tokiam kaip PT7 arba lacUV5 promotoriui, ir T4 fago lizocimą, turintį N-galinę PelB signalinę seką, kontroliuojant araB promotoriui. Vektorius gali būti bet koks čia aprašytas tinkamas vektorius, pavyzdžiui toks kaip pBR322 vektorius.

Ląstelių kultūra

Aukščiau aprašytos transformuotos ląstelės šeimininkės yra fermentuojamos taip, kad ekspresuotų nukleorūgštį, koduojančią polimerazę (pvz., MMuLV-RT) ir nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimą.

Čia vartojami terminai „fermentavimas“ ir „kultivavimas“ vartojami pakaitomis, norint nurodyti dideliais kiekiais auginamas ląsteles auginimo terpėje. Tai apima eksponentinę fazę, kuriai būdingas ląstelių padvigubėjimas, todėl masinis augimas ir stacionari fazė, kai ląstelių augimo greitis ir žūties greitis yra vienodi, dažnai dėl augimą ribojančio veiksnio, tokio kaip pagrindinės maistinės medžiagos išsekimo ir (arba) slopinamojo produkto, tokio kaip organinės rūgšties, susidarymo.

Išradimo procese kiekvieno iš rekombinantinio baltymo ir T4 lizocimo raiška yra kontroliuojama susijusių promotorių indukcijos dėka. Kiekvieno baltymo, pvz., MMLV-RT ir T4 lizocimo promotorių indukcija gali būti atliekama nuosekliai arba vienu metu.

Nukleorūgšties, koduojančios rekombinantinį baltymą ir T4 lizocimą, raiškos indukcija yra vykdoma, pageidautina, į kultūrą pridedant induktorių. Paprastai induktorius pridedamas po to, kai ląstelės yra kultivuojamos, kol pasiekiamas tam tikras optinis tankis, pvz., OD600 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 arba didesnis. Vienaime įgyvendinimo variante T4 lizocimo induktorius yra pridedamas kartu su rekombinantinio baltymo induktoriumi. Vienaime įgyvendinimo variante T4 lizocimo induktorius yra pridedamas nuosekliai po rekombinantinio baltymo indukcijos.

Vienaime įgyvendinimo variante kiekvieno rekombinantinio baltymo ir T4 lizocimo promotorių indukcija vyksta vienu metu. Šiame įgyvendinimo variante T4 lizocimo ir polimerazę koduojančios nukleorūgšties promotoriai gali būti identiški. Nors promotoriai gali būti bet kokie šiam tikslui tinkami promotoriai, pageidautina, kad rekombinantinio baltymo ir polimerazės promotoriai būtų IPTG indukuojami promotoriai, pavyzdžiui, T7 promotoriai.

Vienaime įgyvendinimo variante kiekvieno rekombinantinio baltymo ir T4 lizocimo promotorių indukcija yra nuosekli, o T4 lizocimo promotoriaus indukcija prasideda maždaug po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 arba daugiau valandų po rekombinantinio baltymo promotoriaus indukcijos. Šiame įgyvendinimo variante T4 lizocimą koduojančios nukleorūgšties ir polimerazę koduojančios nukleorūgšties promotoriai turi būti skirtingi tam, kad nukleorūgšties koduojamo rekombinantinio baltymo raiška būtų indukuota prieš nukleorūgšties koduojamo T4 lizocimo raišką arba daug aukštesniu lygiu, kai promotoriai yra indukuojami. Nors promotoriai gali būti bet kokie šiam tikslui tinkami promotoriai, pageidautina, kad rekombinantinio baltymo ir polimerazės promotoriai būtų atitinkamai arabinozės promotorius ir IPTG indukuojamas promotorius.

Kai T4 lizocimo induktorius pridedamas nuosekliai, tai induktorius įprastai pridedamas po to, kai susikaupia norimas kiekis rekombinantinio baltymo (pavyzdžiui, kai nustatoma pagal optinį tankį, pasiekiantį tikslinį kiekį, kuris buvo pastebėtas praeityje, ir kuris koreliuoja su norimu polipeptido kaupimusi). Įprastai T4 lizocimo indukcija vyksta po inokuliacijos, praėjus maždaug 75-90 %, pageidautina maždaug 80-90 % viso fermentacijos proceso laiko.

Pavyzdžiui, T4 lizocimo promotoriaus indukcija gali įvykti praėjus maždaug 30 valandų, pageidautina 32 valandoms, iki maždaug 36 valandų po inokuliacijos fermentacijos procese, trunkančiame 40 valandų. Pavyzdžiui, T4 lizocimo promotoriaus indukcija gali įvykti praėjus maždaug 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 arba daugiau valandų po rekombinantinio baltymo (pvz., MMLV-RT) raiškos indukcijos.

T4 lizocimo indukcija ląstelę padaro pralaidžia taip, kad susiformuotų sferoplastas, išskiriantis rekombinantinį baltymą (pvz., MMLV-RT). Čia vartojamas terminas „padaro pralaidžia“ reiškia angų padarymą ląstelės sienelėje jos visiškai nepašalinant. „Sferoplastas“ – tai ląstelė, kurioje gramneigiamos bakterijos ląstelės sienelė iš dalies prarandama, ir ji tampa sferine. Sferoplastizacija gali būti atliekama gramneigiamas bakterijas apdorojant lizocimu, penicilinu arba pan. Kadangi sferoplastizuotų gramneigiamų bakterijų ląstelių membrana iš dalies prarandama, informaciją apie tikslinio baltymo ir polipeptido sąveiką (elektrofiziologinius pokyčius) galima analizuoti elektrofiziologiniu metodu. Be to, to paties polipeptido didelė koncentracija yra vienos ląstelės sferoplaste, o tai yra palanki sąlyga išmatuoti polipeptido aktyvumą tiksliniame baltyme. Paprastai sferoplastai, kurie išlaiko iš esmės visas sferoplaste esančias nukleorūgštis, tuo pačiu leidžiant viduląsteliniais baltymams (įskaitant rekombinantinį baltymą) judėti per sferoplasto membraną.

Paprastai kultivavimo etapas vyksta esant dideliame ląstelių tankiui, tai yra, kai ląstelių tankis yra nuo 15 iki 150 g sausos masės/litre, pageidautina mažiausiai apie 40, labiau pageidautina apie 40-150, labiausiai pageidautina nuo maždaug 40 iki 100. Be to kultivuoti galima naudojant bet kokius, net labai didelius 100 000 litrų tūrius. Pageidautina, kad tūris būtų apie 100 litrų arba didesnis, pageidautina bent apie 500 litrų, o labiausiai pageidautina nuo maždaug 500 litrų iki 100 000 litrų.

E. coli ląstelės, naudojamos šiame išradime aprašytam dominančiam polipeptidui gaminti, yra kultivuojamos tinkamoje terpėje, kurioje promotoriai gali būti indukuojami, kaip įprastai aprašyta, pvz., Sambrook ir kt.

Sąvokos "terpė", "ląstelių auginimo terpė" ir "fermentacijos terpė" čia vartojamos pakaitomis ir reiškia tirpalą, kuriame yra maistinių medžiagų, reikalingų bakterijoms, t. y. *E. coli*, augti. Paprastai ląstelių auginimo terpėje yra būtinų ir nepakeičiamų aminorūgščių, vitaminų, energijos šaltinių, lipidų ir mikroelementų, kurių ląstelei reikia minimaliam augimui

ir (arba) išgyvenimui. Pageidautina, kad terpė būtų chemiškai apibrėžta tuo, kad visi jos komponentai ir jų koncentracija būtų žinomi. Jei ląstelės kultivuojamos periodinio tiekimo režimu, kaip aprašyta toliau, terminas „kultūros terpė“ reiškia ir bazinę, ir maitinimo terpę, jei nenurodyta kitaip. Terpės pH vertė gali būti bet koks pH nuo 5 iki 9, daugiausia priklausomai nuo šeimininko organizmo.

Norint kaupti rekombinantinį geno produktą, t. y. rekombinantinį baltymą, tokį kaip MMLV-RT, ląstelė šeimininkė yra kultivuojama tokiomis sąlygomis, kurių pakanka geno produktui kaupti. Tokios sąlygos apima, pvz., temperatūrą, maistines medžiagas ir ląstelių tankio sąlygas, kurios leidžia ląstelėje ekspresuoti ir kaupti baltymus. Be to, tokios sąlygos yra tokios, kurioms esant ląstelė gali atlikti pagrindines ląstelines funkcijas – transkripciją, translaciją ir baltymų perėjimą iš vieno ląstelės skyriaus į kitą, skirtą išskiriamiesiems baltymams, kaip tai žinoma šios srities specialistams.

Galimos skirtingos ląstelių kultūros strategijos, įskaitant kultūrą, auginamą uždaroje talpose, perfuzinę kultūrą, nuolatinę kultūrą ir periodinio tiekimo kultūrą.

Viename šio išradimo metodų įgyvendinimo variante temperatūra pakeičiama kultivavimo proceso metu iš pirmosios temperatūros į antrąją, t. y. temperatūra yra aktyviai mažinama. Pageidautina, kad antroji temperatūra būtų žemesnė nei pirmoji. Pirmoji temperatūra gali būti $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antroji temperatūra gali būti intervale nuo $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, pageidautina, kad ji būtų intervale nuo $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, labiau pageidautina, kad ji būtų nuo $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, labiausiai pageidautina, kad ji būtų nuo $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $31\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antroji temperatūra gali būti $29\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ arba $31\text{ }^{\circ}\text{C}$. Viename įgyvendinimo variante pirmoji temperatūra yra $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, o antroji temperatūra yra $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Genų raiška gali būti matuojama mėginyje tiesiogiai, pavyzdžiui, naudojant įprastą *Northern blot* metodą, siekiant kiekybiškai įvertinti mRNR transkripciją (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)).

Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose bakterijos kultivuojamos bioreaktoriuje. Kaip aprašyta čia, buvo įrodyta, kad išradimo metodai yra ypač tinkami didelio masto gamybai, pvz., bioreaktoriuje arba talpose, kurių tūris didesnis nei 1 l. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose bioreaktorių yra mažiausiai apie 1 l tūrio, mažiausiai apie 5 l tūrio, mažiausiai

apie 10 l tūrio, mažiausiai apie 15 l tūrio, mažiausiai apie 20 l tūrio, mažiausiai apie 30 l tūrio, mažiausiai apie 40 l tūrio, mažiausiai apie 50 l tūrio, mažiausiai apie 100 l tūrio, mažiausiai apie 200 l tūrio, mažiausiai apie 250 l tūrio, mažiausiai apie 500 l tūrio, mažiausiai apie 750 l tūrio, mažiausiai apie 1000 l tūrio, mažiausiai apie 1500 l tūrio, mažiausiai apie 2000 l tūrio, mažiausiai apie 2500 l tūrio, mažiausiai apie 3000 l tūrio, mažiausiai apie 3500 l tūrio, mažiausiai apie 4000 l tūrio, mažiausiai apie 5000 l tūrio, mažiausiai apie 7500 l tūrio, mažiausiai apie 10 000 l tūrio, mažiausiai 15 000 l tūrio, mažiausiai 20 000 l tūrio, mažiausiai 30 000 l tūrio, mažiausiai 50 000 l tūrio, mažiausiai apie 100 000 l tūrio, mažiausiai apie 150 000 l tūrio, mažiausiai apie 200 000 l tūrio, mažiausiai apie 250 000 l tūrio, mažiausiai apie 300 000 l tūrio, mažiausiai apie 350 000 l tūrio, mažiausiai apie 400 000 l tūrio, mažiausiai apie 450 000 l tūrio arba mažiausiai apie 500 000 l tūrio.

Kadangi rekombinantinis polipeptidas (pvz., MMLV-RT) yra sėkmingai išskiriamas į ląstelių kultūros supernatantą auginimo proceso metu, rekombinantinis polipeptidas gali būti išskirtas auginimo proceso pabaigoje, atskiriant ląstelių kultūros supernatantą, apimančią rekombinantinį baltymą. Šis metodas sėkmingai pašalina poreikį lizuoti transformuotas ląsteles tam, kad būtų galima išskirti rekombinantinį baltymą. Taip sumažinamas ląstelių nuolaužų kiekis ir nukleorūgščių bei kitų molekulių išsiskyrimas, galintis turėti įtakos rekombinantinio baltyminio produkto kokybei. Ląstelių surinkimas reiškia fermentacijos / kultivavimo pabaigą. Ląstelės gali būti surenkamos bet kuriuo fermentacijos momentu, kuris laikomas pakankamu fermentacijos procesui užbaigti ir ekspresuojamam rekombinantiniam baltymui išgauti. Ląstelių surinkimas gali įvykti nuo 10 iki 60 valandų po sąlygų, leidžiančių ekspresuoti rekombinantinį baltymą, indukcijos. Pavyzdžiui, ląstelės gali būti surenkamos nuo 15 iki 40 valandų po indukcijos. Ląstelių surinkimo metu fermentuota auginimo terpė apima ląsteles, kurios buvo autolizuotos ir kurių membrana padaryta pralaidi. Pavyzdžiui, apie 50% arba daugiau surinktų ląstelių galėjo būti autolizuotos. Kaip alternatyva apie 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 % arba 85 % surinktų ląstelių buvo autolizuotos.

Čia vartojami terminai „ląstelių lizavimas“, „lizė“ arba „lizavimas“ reiškia DNR išsiskyrimą iš ląstelės dėl visiško ląstelės membranos pažeidimo. Jei ląstelė netenka DNR, ji gali būti vertinama kaip nebegyvybinga, t. y. mirusi. Priešingai, „membranos pralaidumas“ ir „pralaidumas“ reiškia ląstelės membranos vientisumo sutrikimą, kuris atsiranda dėl rekombinantinio produkto nutekėjimo į ląstelių kultūros supernatantą be visiškos ląstelės

membranos lizės. Išradimo būdas leidžia išskirti rekombinantinį baltymą visiškai nesuardant ląstelių. Tiksliau, išradimo būdas numato rekombinantinio baltymo išskyrimą, kuris turi būti atliktas be mechaninio ląstelės ardymo; nepridedant egzogeninio fermento, kuris ardo ląstelės sienelę; be ląstelės transformacijos raiškos vektoriais, turinčiais nukleorūgštį, koduojančią egzogeninį fermentą, kuris ardo citoplazminę membraną, pvz. T4 holino baltymą. Atitinkamai, įgyvendinimo variantuose išradimo būdas neapima nė vieno iš šių veiksmų: (i) mechaninio ląstelių ardymo; (ii) egzogeninio fermento, kuris ardo ląstelės sienelę, pridėjimo; ir (iii) ląstelės transformavimo raiškos vektoriais, turinčiais nukleorūgštį, koduojančią egzogeninį fermentą, kuris ardo citoplazminę membraną, pvz. T4 holino baltymą.

Yra žinomi metodai, skirti stebėti ir rekombinantinio produkto išsiskyrimą, ir ląstelių lizę. Abiem bendras metodas yra žymenų molekulių aptikimas, pvz. užląstelinio produkto, parodančio išsiskyrimą arba DNR lizę. Išsiskyrimo matavimo metodai apima fotometriją (Dietzsch, J. Biotechnol., 163, pp. 362-370 (2013); Wurm, Eng. Life Sci., 17 pp. 215-222 (2017)) ir didelio efektyvumo skysčių chromatografiją (Amand, Biotechnol. Prog., 30, pp. 249-255 (2014); Kaiser Eng. Life Sci., 8 pp. 132-138 (2008);). Lizės matavimo metodai apima kolorimetrinius tyrimus rankiniu būdu valdomais fotometrais (*at-line*) arba suporuotus su skysčių valdymo sistemomis (*at/on-line*) (Rajamanickam, Anal. Bioanal. Chem., 409, pp. 667-671 (2017)) ir infraraudonųjų spindulių/ramano spektroskopiją (Abu- Absi, Pharm. Bioprocess., 2, pp. 267-284 (2014); Buckley, Appl. Spectrosc., 71, pp. 1085-1116 (2017); Claßen, Anal. Bioanal. Chem., 409 pp. 651-666 (2017); Sales, Biotechnol. Prog., 33, pp. 285-298 (2017)). Autolizė gali būti netiesiogiai nustatoma pagal DNR koncentraciją išgrynintose surinktose ląstelėse arba pagal talpą.

Sekretuoti rekombinantiniai baltymai yra jautrūs ląstelių kultūros nestabilumui, pavyzdžiui, agreguoja ir suformuoja netinkamą erdvinę struktūrą po sekrecijos / ląstelių lizės. Tam tikrų įgyvendinimo variantų atveju į ląstelių kultūrą pridedama stabilizuojančio agento. Stabilizatorius gali būti pridedamas prieš fermentaciją, jos metu arba po jos. Tinkamų stabilizatorių pavyzdžiai yra kalio chloridas, DTT, natrio chloridas, trehalozė, sacharozė, glicinas, betainas, manitolis, kalio citratas, CuCl₂, prolinas, ksilitolis, NDSB 201, CTAB, K₂PO₄ Na₂SO₄ ir Brij 35. Tam tikruose įgyvendinimo variantuose stabilizuojantis priedas gali apimti aminorūgštis, tokias kaip argininas.

Tam tikruose įgyvendinimo variantuose gali būti naudojamas nukleorūgštis inaktyvavimo agentas (pvz., benzonazė) tam, kad būtų pašalinta laisvą nukleorūgštis (DNR ir (arba) RNR) iš ląstelių kultūros. Nukleorūgštis inaktyvavimo agentas gali būti pridėtas prieš fermentaciją, jos metu arba po jos. Pageidautina, kad prieš skaidrinant ląstelių kultūrą nukleorūgščių inaktyvavimo agentas nebūtų centrifuguojamas. Taigi, bet kuris išradimo būdas gali apimti (i) nukleorūgštis (pvz., DNR) inaktyvavimo agento (tokio kaip benzonazės) pridėjimą į ląstelių kultūrą, nesant tolesnio centrifugavimo etapo.

Nuskaidrinimas

Pagal šio išradimo metodus autolizuotos ir (arba) pralaidžios ląstelės yra atskiriamos nuo auginimo terpės prieš produkto išskyrimą ir produkto išgryninimą iš užląstelinės terpės nuskaidrinant.

Čia vartojami terminai „nuskaidrinti“, „nuskaidrinimas“, „skaidrinimo pakopa“ reiškia procesą, apimantį vieną arba daugiau pakopų, naudojamą kietoms priemonėms pašalinti iš ląstelių kultūros tam, kad būtų gautas skystas neapdorotas filtratas, kuriame yra rekombinantinis baltymas.

Nuskaidrinimo pakopos efektyvumas yra labai svarbus siekiant palengvinti tolesnius apdorojimo etapus, kai reikia išvalyti dominančią biomolekulę. Parametrai, galintys turėti įtakos nuskaidrinimo pakopai, apima bendrą ląstelių koncentraciją, ląstelių gyvybingumą, pradinį nuskaidrinimui skirtos ląstelės kultūros drumstumą, kultivuojamų ląstelių gaminamos biomolekulės koncentraciją ir ląstelių liekanų dydį. Čia vartojamas terminas "bendra ląstelių koncentracija" (TCC) reiškia ląstelių skaičių tam tikrame kultūros tūryje. Čia vartojamas terminas "gyvybingų ląstelių koncentracija" (VCC) reiškia gyvų ląstelių skaičių tam tikrame kultūros tūryje, nustatytą standartiniais, žinomais, gyvybingumo tyrimais. Čia vartojamas terminas „gyvybingumas“ reiškia gyvų ląstelių procentinį kiekį. Įprastai kuo didesnis TCC, tuo didesnė biomasė, kurią reikia pašalinti iš ląstelių kultūros, ir tuo didesnis poveikis nuskaidrinimui. Čia vartojamas terminas „drumstumas“ reiškia skysčio drumstumą arba miglotumą, kurį sukelia daug atskirų dalelių. Visų pirma, drumstumas rodo medžiagos ir mažų dalelių kiekį skystyje, galinčių išsklaidyti šviesą. Įprastai ląstelių kultūros drumstumas koreliuoja su esančiomis kultūroje ląstelėmis, ląstelių liekanomis, nukleorūgštimis ir ląstelių šeimininkų baltymu (HCP) papildomai prie rekombinantinio polipeptido.

Nuskaidrinimo pakopa sumažina pradinį fermentuotos ląstelių kultūros drumstumą iki mažesnio nuskaidrintos ląstelių kultūros drumstumo tam, kad būtų gauta nuskaidyta ląstelių kultūra su didžiausia dominančios biomolekulės koncentracija ir mažesniu kiekiu kitos ląstelių kultūros medžiagos.

Viename įgyvendinimo variante pradinis fermentuotų ląstelių kultūros drumstumas yra didesnis nei apie 10 000 NTU, apie 20 000 NTU, apie 30 000 NTU. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose pradinis fermentuotų ląstelių kultūros drumstumas yra tarp maždaug 10 000 NTU ir maždaug 150 000 NTU, tiksliau, apima nuo maždaug 30 000 NTU iki maždaug 100 000 NTU.

Viename įgyvendinimo variante nuskaidrintos ląstelių kultūros drumstumas yra lygus arba mažesnis už maždaug 40, 30, 25 arba 20 NTU. Pageidautina, kad nuskaidrintos ląstelių kultūros drumstumas būtų lygus maždaug 20 NTU arba mažesnis.

Tam, kad nuskaidrinimo metodas būtų efektyvus, taip pat svarbu maksimaliai padidinti našumą. Čia vartojami terminai „našumas“ arba „įkrovos talpa“ arba „talpa“ gali būti vartojami pakaitomis, ir nurodo tūrį, nuskaidrintą skaidrinimo funkcionaliajame vienetė, pavyzdžiui, per filtrą išfiltruotą tūrį, tiksliau, tūrį, normalizuotą pagal filtro plotą (L/m^2).

Išradimo ląstelių kultūros nuskaidrinimas apima pirminį nuskaidrinimo etapą. Čia vartojami terminai „pirminis nuskaidrinimas“ reiškia didelių dalelių, tokių kaip visos ląstelės ir ląstelių nuolaužos, pašalinimą. Įgyvendinimo variantuose po pirminio nuskaidrinimo gali sekti antrinis nuskaidrinimo etapas. Čia vartojamas terminas „antrinis nuskaidrinimas“ įprastai reiškia mažesnių dalelių, pvz., dalelių mažesnių nei visos ląstelės, pašalinimą. Kiekviename iš pirminio ir antrinio nuskaidrinimo etapų kaip nuskaidrinimo funkcionalusis vienetas naudojamas filtras.

Tinkamiausiame įgyvendinimo variante pirminis nuskaidrinimo etapas ir (arba) antrinis nuskaidrinimo etapas yra mikrofiltravimas. Įprastai mikrofiltravimas naudojamas 0,1–10 μm dydžio dalelėms atskirti nuo tirpalo. Dažniausiai jis naudojamas atskirti polimerą, kurio molekulinė masė yra 1×10^5 g/mol. Be to, mikrofiltravimas gali būti naudojamas nuosėdoms, pirmuoniams, didelėms bakterijoms ir kt. pašalinti. Šiame išradime mikrofiltravimas gali būti lengvai naudojamas ištisoms ląstelėms ir ląstelių nuolaužoms pašalinti. Įprastai

mikrofiltravimo procesas atliekamas naudojant slėgio siurbį arba vakuuminį siurbį, kurio greitis yra 0,1-5 m/s, pageidautina 1-3 m/s, ir slėgis 50-600 kPa, pageidautina 100-400 kPa.

Tinkamiausiame įgyvendinimo variante pirminis nuskaidrinimo etapas ir (arba) antrinis nuskaidrinimo etapas yra giluminis filtravimas. Čia vartojamas terminas „filtravimas giluminiu būdu“ reiškia technologiją, kuri išnaudoja tam tikro poėtumo filtrus tam, kad būtų sulaikytos terpės daleles visame filtre, o ne tik ant filtro paviršiaus. Giluminiai filtrai įprastai yra sudaryti iš celiuliozės pluoštų arba sintetinių polimerinių pluoštų, tokių kaip poliakrilas arba polistirenas. Šie pluoštai sudaro trimatį tinklą su tam tikru porėtumu. Giluminis filtras gali būti tinkamas pirminiam ir (arba) antriniam išskyrimui arba tik pirminiam arba antriniam išskyrimui. Filtrai, tinkami pirminiam ir (arba) antriniam regeneravimui, taip pat žinomi kaip "vienpakopiai filtrai". Vienpakopiai filtrai gali būti naudojami tiek pirminiam, tiek antriniam išskyrimui atlikti, arba jie gali būti naudojami kaip filtrai pirminiam išskyrimui ir kartu su tolesniu antrinio išskyrimo filtro naudojimu. Tam tikruose įgyvendinimo variantuose šis giluminis filtras yra teigiamai įkrautas. Sąveika tarp teigiamai įkrauto filtro ir koloidinių dalelių fermentuotoje ląstelių kultūroje sėkmingai leidžia pašalinti tokias mažas priemaišas, o didesnes daleles sulaiko filtro matricos porėtumas.

Filtras gali būti sudarytas iš įvairių medžiagų, gerai žinomų šioje srityje. Tokios medžiagos gali apimti, bet neapsiribojant, polimerines medžiagas, tokias kaip nailonas, celiuliozės medžiagas (pvz., celiuliozės acetatą), polivinilideno fluoridą (PVDF), polietersulfoną, poliamidą, polisulfoną, polipropileną ir polietileno tereftalatą. Tam tikrų įgyvendinimo variantų atveju filtrai, naudotini ląstelių lizatams nuskaidrinti, gali apimti, bet neapsiribojant, Stax™ giluminių filtrų sistemas (Pall Life Sciences), ULTIPLAT PROFILE™ filtrus (Pall Corporation, Port Washington, NY), SUPOR™ membraninius filtrus (Pall Corporation, Port Washington, NY). Prekyboje parduodami giluminiai filtrai apima Stax™ giluminių filtrų sistemas (Pall Life Sciences), Millistak+ Pod giluminių filtrų sistemą, XOHC media (Millipore Corporation), Zeta Plus™ giluminį filtrą (3M Purification Inc.) ir kt.

Įgyvendinimo variantuose pirminis nuskaidrinimas atliekamas pirmuoju filtru, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai apie 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0 μm (mikrometras) arba didesnes sulaikymo ribas. Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį,

kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 20,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 9,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 3,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 0,8 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 1,0 μm iki maždaug 3,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 1,0 μm iki maždaug 20,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 1,0 μm iki maždaug 9,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 4,0 μm iki maždaug 20,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante pirmasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 4,0 μm iki maždaug 9,0 μm . Tam tikrame įgyvendinimo variante pirmoji nuskaidrinimo pakopa yra atliekama panaudojant pirmąjį giluminį filtravimą.

Nuskaidrinimo efektyvumą galima pagerinti padidinus filtro pralaidumą. Čia vartojami terminai „pralaidumas“ arba „įkrovos talpa“ arba „talpa“ yra vartojami pakaitomis ir nurodo tūrį, nuskaidrintą funkcionalių nuskaidrinimo vienetų, pavyzdžiui, per filtrą išfiltruotą tūrį, tiksliau, tūrį, normalizuotą pagal filtro plotą (L/m^2).

Viename įgyvendinimo variante pirminio nuskaidrinimo etapo maksimalus pralaidumas yra lygus mažiausiai 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 L/m^2 .

Įgyvendinimo variantuose antrinis nuskaidrinimas atliekamas antruoju filtru, pvz. giluminis filtras, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0 μm arba didesnes sulaikymo ribas. Kitame įgyvendinimo variante antrasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 3,0 μm . Kitame įgyvendinimo variante antrasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 0,8 μm . Kitame įgyvendinimo variante antrasis filtras turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 1,0 μm iki maždaug 3,0 μm . Tam tikrame

įgyvendinimo variante antrasis nuskaidrinimo etapas vykdomas panaudojant antrąjį giluminį filtravimą.

Įgyvendinimo variantuose pirminio nuskaidrinimo ir antrinio nuskaidrinimo etapuose naudojamas tokio paties porų dydžio filtras. Įgyvendinimo variantuose ir pirmasis, ir antrasis filtrai turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 0,4 μm iki maždaug 0,8 μm . tiek pirmasis, tiek antrasis filtrai turi porų dydį, kuris užtikrina sulaikymo ribas nuo maždaug 1,0 μm iki maždaug 3,0 μm .

Viename įgyvendinimo variante antrinio nuskaidrinimo etapo maksimalus pralaidumas yra lygus mažiausiai 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 L/m².

Viename šio išradimo įgyvendinimo variante prieš pirminį nuskaidrinimą atliekamas ląstelių kultūros išankstinio apdorojimo etapas, siekiant padidinti nuskaidrinimo efektyvumą, tokį kaip flokuliaciją.

Čia vartojamas terminas „flokuliacija“ reiškia netirpių dalelių, tokių kaip ląstelių medžiaga, įskaitant ląsteles, ląstelių liekanas, ląstelės šeimininkės baltymus, DNR ir kitus komponentus, agregaciją, nusodinimą ir (arba) aglomeraciją, kurią sukelia tinkamo flokuliavimo agento pridėjimas į fermentuotą ląstelių kultūrą. Padidinus netirpių komponentų, esančių fermentuotoje ląstelių kultūroje, dalelių dydį, pagerėja atskyrimo efektyvumas, pavyzdžiui, nuskaidrinimas filtruojant. Flokuliaciją galima inicijuoti žinomais metodais, įskaitant ląstelių kultūros pH vertės sumažinimą arba flokuliavimo agento pridėjimą. Neribojami flokuliavimo agento pavyzdžiai: kalcio fosfatas, kaprilo rūgštis, divalenčiai kationai arba teigiamai įkrauti polimerai, tokie kaip poliaminas, polietileniminas (PEI), chitozanas arba polidialildimetilamonio chloridas (pvz., pDADMAC), kurie sukelia dalelių agregaciją dėl sąveikos su neigiamo krūvio ląstelių paviršiumi ir ląstelių liekanomis. Viename įgyvendinimo variante flokuliavimo agentas yra teigiamai įkrautas polimeras, pageidautina polietileniminas (PEI). Įgyvendinimo variantuose flokuliavimo agentas yra PEI ir yra pridodamas į fermentuotą ląstelių kultūrą nuo maždaug 0,10 % (t/t) iki maždaug 0,50 % (t/t). Įgyvendinimo variantuose flokuliavimo agentas yra PEI ir į fermentuotą ląstelių kultūrą pridedama koncentracija yra nuo maždaug 0,15 % (t/t) iki maždaug 0,25 % (t/t). Įgyvendinimo variantuose flokuliavimo agentas pridedamas į fermentuotą ląstelių kultūrą

koncentracija lygia maždaug 0,10 % (t/t), 0,15 % (t/t), 0,20 % (t/t), 0,25 % (t/t) arba 0,30 % (t/t). Įgyvendinimo variantuose flokuliavimo agentas yra PEI ir į fermentuotą ląstelių kultūrą pridedama koncentracija yra lygi maždaug 0,15 % (t/t) arba maždaug 0,25 % (t/t).

Viename įgyvendinimo variante flokuliavimo agentas yra tiesiogiai pridedamas į fermentuotą ląstelių kultūros skystį fermentacijos pabaigoje, o flokuluota medžiaga, įskaitant ląsteles, yra pašalinama iš ląstelių kultūros skysčio filtruojant. Viename įgyvendinimo variante flokuliavimo agentas pridedamas prieš surenkant ląsteles.

Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose fermentacija ir nuskaidrinimas atliekami kaip uždaros sistemos metodas. Čia vartojamas terminas „uždaros sistemos metodas“ reiškia metodą arba procesą, kuris atliekamas uždaroje sterilioje sistemoje kontroliuojamos aplinkos sąlygomis, nekeliant jokios išorinio užteršimo iš operatoriaus arba laboratorijos aplinkos rizikos. Kuriant GGP klasės produktus ypač svarbu naudoti uždarą sistemą. Iš esmės pageidaujamuose įgyvendinimo variantuose išradimo metodai yra uždarų sistemų metodai, kurie neapima centrifugavimo, nes centrifugavimas negali būti atliktas uždaroje sistemoje ir reikalauja tarpinio produkto (lizuotų ląstelių) perkėlimo į centrifugavimo indus. Nuskaidrinimas po fermentacijos gali būti atliekamas perduodant fermentuotą kultūrą iš bioreaktoriaus srautu uždaroje vamzdelių sistemoje į nuskaidrinimo filtrus, be jokio kontakto su operatoriumi.

Tolesnis išvalyto baltymo apdorojimas

Įgyvendinimo variantuose rekombinantinis baltymas gali būti išskirtas tiesiogiai iš nuskaidrintos auginimo terpės. Po rekombinantinio baltymo išskyrimo gali būti atliekamas gryninimas, siekiant užtikrinti tinkamą rekombinantinio baltymo grynumą. Įvairūs baltymų gryninimo būdai yra gerai žinomi šios srities specialistams.

Tinkami valymo būdai apima, bet tuo neapsiriboja, yra nusodinimas amonio sulfatu arba etanoliu, ekstrakcija rūgštimi, gelio elektroforezė, imunoadsorbcija, anijonų arba katijonų mainų chromatografija, fosfoceliuliozės chromatografija, hidrofobinės sąveikos chromatografija, giminingumo chromatografija, imuninio giminingumo chromatografija, gelfiltracija, skystinė chromatografija (LC), didelio efektyvumo LC (HPLC), aukšto našumo LC (FPLC), hidroksiapatito chromatografija, lektino chromatografija ir imobilizuoto metalo

giminingumo chromatografija (IMAC). Labiausiai pageidautina, kad rekombinantiniai baltymai būtų išgryninti skysčių chromatografijos metodų, įskaitant jonų mainų, giminingumo ir gelfiltraciją.

Taigi išradimo metodai pateikia iš esmės grynus rekombinantinius baltymus. Iš esmės grynas, kaip čia vartojama, reiškia preparatą arba mėginį, kuriame iš esmės nėra priemaišų komponentų, baltymų ir kt.

Visame šios specifikacijos aprašyme ir teiginiuose žodžiai „apima“ ir „sudėtyje yra“ bei jų variantai reiškia „įskaitant, bet neapsiribojant“, ir jie nėra skirti (ir neatmeta) kitų dalių, priedų, komponentų arba pakopų. Visame šios specifikacijos aprašyme ir apibrėžtyje vienaskaita apima daugiskaitą, nebent kontekstas reikalauja kitaip. Visų pirma, kai naudojamas neapibrėžtas artikelis, specifikacija turi būti suprantama kaip apimanti daugiskaitą ir vienaskaitą, nebent kontekstas reikalauja kitaip.

Požymiai, sveikieji skaičiai, charakteristikos, junginiai, cheminės dalys arba grupės, aprašytos kartu su konkrečiu išradimo aspektu, įgyvendinimu arba, pavyzdžiui, turi būti suprantami kaip taikytini bet kuriam kitam čia aprašytam aspektui, įgyvendinimui arba, pavyzdžiui, nebent jie su jais nesuderinami. Visos savybės, atskleistos šioje specifikacijoje (įskaitant bet kokias kartu pateiktas apibrėžtis, santraukas ir brėžinius) ir (arba) visi taip atskleisto metodo arba proceso etapai gali būti derinami bet koku deriniu, išskyrus derinius, kuriuose bent kai kurios iš tokių savybių ir (arba) etapų yra vienas su kitu nesuderinami. Išradimas neapsiriboja bet kokių anksčiau pateiktų įgyvendinimo variantų detalėmis. Išradimas apima bet kurį naują arba bet kokią naują šioje specifikacijoje atskleistų savybių derinį (įskaitant bet kokias kartu esančias apibrėžtis, santraukas ir brėžinius), arba bet kurį naują, arba bet kokią naują bet kurio metodo arba proceso etapų derinį, tokiu būdu atskleistą.

Skaitytojo dėmesys atkreipiamas į visus straipsnius ir dokumentus, kurie yra pateikti kartu su šia specifikacija arba iki jos pateikimo, susijusius su šia paraiška, ir kurie yra atviri visuomenei susipažinti su šia specifikacija, o visų tokių straipsnių ir dokumentų turinys čia įtrauktas kaip nuoroda.

Pavyzdžiai

1 pavyzdys - Medžiagos ir metodai

Molonio pelių leukemijos viruso (MuLV) atvirkštinės transkriptazės geno (RT) konstravimas

MuLV-RT genas buvo klonuotas taip, kad būtų kontroliuojamas indukuojamo promotoriaus P_{tac}. ekombinantinė plazmidė buvo vadinama pMuLV-RT-Km (1A pav.). MuLV-RT aminorūgščių seka čia atskleista kaip SEQ ID Nr. 1.

T4 bakteriofago lizocimo geno gpe konstravimas

T4 bakteriofago lizocimo genas *gpe* su pelB signaliniu peptidu buvo klonuotas į pAra vektorių (Thermo Fisher) po araB promotoriaus (plazmidė pAra-pelB-gpe). Plazmidė pAra-pelB-gpe turi replikacijos pradžią, gautą iš pACYC, ir atsparumo chloramfenikoliui geną, kuris leidžia naudoti *E. coli* raiškos sistemas, kuriose yra ColE1 tipo plazmidės (1B pav.).

Šiame pavyzdyje buvo panaudotas sukonstruotas polipeptidas, vadinamas Gpe, kurio seka kilusi iš *Escherichia coli* T4 bakteriofago lizocimo – NCBI referentinė seka: NP_049736.1, baltymo pavadinimas: glikozido hidrolazės šeimos baltymas [*Escherichia fagus* T4]. PelB signalinė seka: 1 - 22, T4 bakteriofago lizocimas 23 -164. Gpe aminorūgščių seka su PelB signaline seka čia atskleista kaip SEQ ID Nr. 2.

Raiškos kamieno paruošimas

E. coli kamienas JS007 („Thermo Fisher Scientific“) buvo transformuotas plazmidėmis pMuLV-RT-Km (turinti atvirkštinės transkriptazės raiškos geną) ir pAra-pelB-gpe (turinti T4 bakteriofago lizocimo *gpe* geną) ir uždėtos ant LB agarą su kanamicinu (50 g/l), chloramfenikoliu (25 g/l). Transformacija buvo pagrįsta kalcio temperatūrinio šoko metodu. Buvo sukurtas tyrimų ląstelių bankas.

Auginimo terpė

Transformacijos ir plazmidžių dauginimas buvo atliekamas ant kietos LB terpės, kurioje yra peptonas (10 g/l), mielių ekstraktas (5 g/l), NaCl (10 g/l) ir kietai terpei 15 g/l mikrobiologinis agaras, taip pat reikalingi antibiotikai. Periodinio tiekimo kultūros ir kultūros,

auginamos uždaroje talpose, kultivavimas buvo atliekami glicerolio pagrindu pagamintame mikrobiologiniame sultinyje, kurio sudėtis (litre): peptonas 12 g, mielių ekstraktas 5 g, NH_4Cl 2,68 g, NaCl 1,5, KH_2PO_4 6 g, K_2HPO_4 4 g, glicerolis nuo 4 iki 10 g. Be to, prieš auginimą TB10 terpė buvo papildyta šiais steriliais tirpalais: 2 ml/l MgSO_4 (1 M), ir 2 ml mikroelementų tirpalo, kurio sudėtis (litre): $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,18 g, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 20,1 g, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 16,7 g, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,16 g, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,18 g; taip pat 1 ml kanamicino (50 mg/ml) ir 1 ml chloramfenikolio (30 mg/l).

Raiškos ir autolizės sąlygos purtomose kolbose

Inokuliatas, skirtas serijinei baltymų gamybai purtomose kolbose, buvo paruoštas per naktį kultivuojant 2000 ml purtomose kolbose su 500 ml TB4 terpės, kurioje yra 4 g/l glicerolio 37 °C temperatūroje. Baltymų gamybai atitinkama užsėjimo kultūra buvo perkelta į šviežią TB terpę, kurioje yra 10 g/l glicerolio, iki galutinio 50 ml tūrio 250 ml Erlenmejerio purtymo kolbose. Kultūra buvo kultivuojama 37 °C temperatūroje ir 220 aps./min., kol pasiekė ląstelių tankį OD600 1,5. Tikslinio geno raiškai purtymo kolboje buvo pridėta izopropil- β -D-galaktozido (IPTG) tiek, kad galutinė koncentracija būtų 0,1 mM. Po 5 valandų lizės geno raiškai purtymo kolboje buvo pridėta L-arabinozės tiek, kad galutinė koncentracija būtų 0,5 g/l. Temperatūra indukcijos taške buvo pakeista į 25 °C. Pridėjus L-arabinozės, mėginiai buvo paimti praėjus 1 valandai. Ląstelių koncentracijai įvertinti buvo išmatuotas terpės optinis tankis esant 600 nm (OD600).

Mėginio paruošimas SDS-PAGE

1 ml kultūros mėginiai buvo paimti iš kolbų, *Pierce™ Universal Nuclease Cell Lysis* įpilama į 1 ml ląstelių kultūros ir centrifuguojama 1 minutę 13 000 aps./min. Tuomet terpės frakcija buvo naudojama tolesnei analizei - į 40 μl terpės frakcijos buvo pridėta 50 μl 2X Tris-glicino SDS mėginio buferio, po to - 10 μl 10X mėginį redukuojančio agento tam, kad galutinis mėginio tūris būtų 100 μl . Ląstelių nuosėdos buvo resuspenduotos 100 μl Tris-glicino SDS mėginio buferio su redukuojančiu agentu. Mėginiai kaitinami 10 minučių 95 °C temperatūroje. Į kiekvieną 12 % SDS-PAGE gelio takelį buvo užnešta 5 μl mėginio.

Raiškos ir autolizės sąlygos bioreaktoriuje

Inokuliatas, skirtas serijinei baltymų gamybai purtomose kolbose, buvo paruoštas per naktį kultivuojant transformantą 2000 ml purtomose kolbose su 500 ml BenzoAOF10 terpės, kurioje yra 10 g/l of glicerolio, esant 25 °C temperatūrai ir 180 apsisukimų per minutę greičiui. Serijos fazė buvo atlikta 5 l *Univessel Glass Biostat A* bioreaktoriuose (Sartorius), kurių pradinis terpės tūris buvo 3 litrai. Kultūros augimo dinamika buvo stebima optinio tankio matavimais esant 600 nm bangos ilgiui. Mėginiai iš bioreaktorių buvo imami įvairiais proceso etapais ir analizuojami. Bioreaktoriai užsėjami naktiniu inokuliatu (užsėjimo tūris suskaičiuotas taip, kad būtų pasiektas tikslinis užsėjimo optinis tankis 0,15 OV). Pradiniai auginimo parametrai prieš tikslinio baltymo ir tuo pačiu metu sukeliama lizės indukciją buvo tokie: ištirpusio deguonies (DO) kontrolė buvo palaikoma 30 % automatine kaskada: oro srautas (nuo 1,5 iki 4,8 Lpm); maišymo greitis (nuo 420 iki 800 aps./min.); gyno deguonies srautas (nuo 0 iki 4,8 Lpm). Kultūros pH vertė buvo kontroliuojamas ties $7,0 \pm 0,1$ automatiškai pridedant NH_4OH (25 %) arba H_3PO_4 (42,5 %). Prieš MuLV-RT indukciją (MuLV-RT indukcijos taškas: $7,0 \pm 0,5$ OD) buvo palaikoma 37°C auginimo temperatūra. Po indukcijos 0, 1 mM IPTG temperatūra visuose procesuose buvo sumažinama nuo 37 iki 28 °C per 40 minučių laikotarpį. Po IPTG indukcijos buvo pradėtas DO profilis: nuo 30 % iki 3 % per 40 minučių. Praėjus 6 valandoms po IPTG indukcijos, lizocimo sintezė buvo sukelta pridedant 0,5 g/l arabinozės. Norint atlikti galutinę lizę, praėjus 1 valandai po lizocimo indukcijos, buvo pradėtas osmozinis šokas, įpilant 1 M sacharozės, 0,5 M Na_2SO_4 ir 0,5 % (m/t) Brij 24 tiesiai į indą. Po 20 minučių pH ir DO valdikliai buvo išjungiami, nustatomas maišyklės greitis 200 aps./min. Maišymas buvo atliekamas per naktį (14 ± 2 val.). Po osmozinio šoko fazės buvo pradėtos ląstelių surinkimo/ nuskaidrinimo pakopos.

Fermentavimo kultūros nuskaidrinimas

Norint nuskaidrinti fermentavimo kultūrą, į bioreaktorių įpilama PEI (lupasolis, polietileniminas, BASF) iki galutinės koncentracijos 0,25 % (t/t), ir maišymas tęsiamas 15 - 20 min 200-300 aps./min. Medžiaga perkeliama iš bioreaktoriaus į atskiras talpas ir maišoma su vandeniu santykiu 2:4 - 2:5 (t/t) 200-300 aps./min., 10-20 min. Kultūra paliekama sedimentacijai 2-4 valandas. Po sedimentacijos viršutinė kultūros dalis yra nuskaidrinama filtruojant per giluminio filtravimo kapsules *Supracap100 P050* (ID: NP5LP0501). Po giluminio filtravimo, tangentinis srauto filtravimas atliekamas panaudojant 0,3 m² TFF kasetę (ID: OS030T12) su koncentracijos koeficientu 10X.

Išsamiau, nuskaidrinimo pakopa apima (6 pav.):

Pradinė medžiaga: 250 l lizuotų ląstelių kultūros, po 16-18 val. tikslinio baltymo raiškos maišomuose rezervuaro reaktoriuose. Galutinis ląstelių/ ląstelių nuolaužų OD ~15-30 OD. Analizė parodė, kad sukeltos ląstelių lizės rezultatas buvo 75–80 % ląstelių lizės efektyvumo, skaičiuojant pagal bendrą ląstelių kiekį.

Visų operacijų metu maišomame bioreaktoriaus (*Hyperforma™* 300L, Thermofisher Scientific) rezervuare visi automatiniai valdikliai fermentacijos inde kontroliuoja: oro/O₂ srautas, pH buvo „išjungtame režime“. Maišymas buvo palaikomas 375 aps./min., ir temperatūra nustatyta < 12 °C.

Fermentų stabilizavimas ir nukleorūgščių flokuliacija. Sausos medžiagos buvo pridamos tiesiai į bioreaktoriaus indą po vieną tam, kad būtų pasiekta galutinė 1 M sacharozės, 0,5 M Na₂SO₄ ir 0,5 % Brij 35 koncentracija. Didelio klampumo tirpalas buvo kruopščiai maišomas 375 aps./min. greičiu 60 minučių < 12 °C temperatūroje. Po to maišymas 100 aps./min. buvo palaikomas 10-18 valandų <12 °C. Flokuliacija buvo atliekama į bioreaktoriaus indą pridant PEI (lupasolis, polietileniminas, BASF) tam, kad būtų pasiekta galutinė koncentracija 0,25 % (t/t). Maišymas tęsiamas mažiausiai 15 minučių, esant 375 aps./min. Tirpalas buvo perkeltas į atskiras talpas iš bioreaktoriaus, skiedžiamas vandeniu (molekulinės biologijos grynumo lygio) 2,5 karto, maišomas 200-300 aps./min. greičiu 10-20 min. Po to maišymas buvo visiškai sustabdomas. Kultūra buvo paliekama sedimentacijai ~ 3 valandoms.

Nuskaidrinimas: filtro paruošimas. Reikalingas kiekis STAX filtro kapsulių K050P (Pall, ID 7007836) buvo plaunamas 10-ies filtrų tūrio vandeniu. Neviršijant 0,2 BAR slėgio priešslėgio. Po sedimentacijos viršutinė kultūros dalis buvo nuskaidrinama filtruojant per giluminio filtravimo kapsules K050P (Pall, ID 7007786). Sulaikymas 0,4-0,8 μM (1 l fermentacijos terpės nufiltruoti reikia apie 0,05 m² filtro ploto), neviršijant 1,2 priešslėgio BAR, ir vėliau buvo filtruojama per 0,22 μm filtro kapsulę (Pall, ID NP6UEAVP1S). Antrinis nuskaidrinimas buvo atliekamas panaudojant 0,22 μm filtro kapsulę (Pall, ID NP6UEAVP1S). Tą patį nuskaidrinimo procesą būtų galima atlikti panaudojant filtravimo sistemas: 1-3 μM (P100) (Pall, ID 7007836).

2 pavyzdys – rezultatai ir diskusija

E. coli nėra tobulas šeimininkas, ypač uždarai vienkartiniai fermentacijai, nes jis įprastai neišskiria baltymų į užląstelinę terpę. Ląstelių ardymo žingsnis tampa ribojimu ir nėra ekonomiškai efektyvus eksperimentiniu arba pramoniniu mastu, kai tikslas yra uždaro ir (arba) tęstinio proceso srauto įgyvendinimas. Šis išradimas pateikia ląstelių ardymo metodą, kuris yra užprogramuota ląstelių lizės sistema, pagrįsta klonuoto T4 bakteriofago geno *gpe* raiška tam, kad būtų gaminamas lizavimo baltymas. Genas *gpe* koduoja lizocimą, kuris skaido *E. coli* ląstelės sienelės peptidoglikaną.

Buvo sukurta save ardanti *Escherichia coli*, kuri gamina svetimą tikslinį baltymą. *E. coli* JS007 buvo kotransformuota kartu su dviem vektorinėmis plazmidėmis - tikslinio geno raiškos vektoriumi pMuLV-RT-Km ir lizavimo geno raiškos vektoriumi pAra-pelB-*gpe*. Lizavimo baltymas buvo pagamintas po tikslinio geno raiškos, todėl ląstelių ardymo procesas buvo supaprastintas. Šiame pavyzdyje klonuoto T4 fago geno *gpe* raiška buvo panaudota *E. coli*, kurios gamina MuLV-RT kaip tikslinį baltymą, suardymui. Genas *gpe* raiška nesukėlė greito ląstelių ardymo, bet susilpnino ląstelės sienelę. Lizavimo baltymo *Gpe* perkėlimas iš citoplazmos į periplazmą palengvino mureino sluoksnio, atsakingo už ląstelių struktūros tvirtumo palaikymą, fermentinį skaidymą. Mikroskopinis stebėjimas atskleidė, kad ląstelės, gaminančios *Gpe* periplazminėje erdvėje po 1 valandos, patyrė morfologinius pokyčius – nuo lazdelės formos iki elipsės formos sferoplastų (2 pav.).

Po 2 valandų indukcijos 0,5 g/l L-arabinozės *E. coli* JS007 pMuLV-RT-Km, pAra-pelB-*gpe* optinis tankis sumažėjo (3 pav.), ir auginimo terpėje buvo pastebėtos *E. coli* ląstelių nuolaužos, o tai rodo, kad įvyko ląstelių lizė. 12 % SDS-PAGE parodė, kad viduląsteliniai baltymai buvo atpalaiduoti į auginimo terpę, ir MuLV-RT baltymas buvo identifikuotas biomasės ir auginimo terpės mėginiuose (4 pav.).

Serijiniai MuLV-RT gamybos procesai Biostat A maišomame bioreaktoriuje buvo suprojektuoti su pradiniu 3 l terpės tūriu. Kaip parodyta 5 paveiksle, prieš MuLV-RT indukciją (MuLV-RT indukcijos taškas: $7,0 \pm 0,5$ OD) buvo palaikoma 37°C auginimo temperatūra. Po tikslinio baltymo indukcijos 0,1 mM IPTG (MuLV-RT indukcijos taškas: $7,0 \pm 0,5$ OD) temperatūra visuose procesuose buvo sumažinta nuo 37 iki 28 °C per 40 minučių laiko tarpą, ir pradėtas DO profilis: nuo 30 % iki 3 % daugiau kaip per 40 minučių. Praėjus 6 valandoms

po IPTG indukcijos, lizocimo sintezė buvo sukelta pridedant 0,5 g/l arabinozės. Norint atlikti galutinę lizę, praėjus 1 valandai po lizocimo indukcijos, osmozinis šokas buvo inicijuotas pridedant 1 M sacharozės, 0,5 M Na₂SO₄ ir 0,5 % (m/t) Brij 24 ir paliekamas per naktį.

Giluminiu filtravimu pagrįstas ląstelių nuolaužų nuskaidrinimas be nukleazės apdorojimo. Čia buvo naudojamas geriausias didelį jonų stiprumą sukuriančių druskų, osmozinių agentų ir detergento mišinys, skirtas fermentams stabilizuoti, užkirsti kelią nuosėdoms/ agregacijai, užkirsti kelią sąveikai su labai hidrofobišku lizocimu ir membranos baltymais. Nukleorūgščių flokuliacija taip pat buvo naudojama tam, kad būtų sukurta filtravimo plokštelė, apimanti mažas flokuliacijos daleles. Tai sėkmingai įrodoma naudojant filtrus su neįprastu 0,4-08 µm porų dydžiu. Taip pat tinka filtrai su su 1-3 µm porų dydžiu. *E. coli* ląstelės dydis yra: 1,0-2,0 mikrometrų ilgio, spindulys apie 0,5 mikrometro. Pirminis nuskaidrumo metodas, paprastai rekomenduojamas *E. coli* bakterijoms, yra tangentinio srauto filtravimas, kai porų dydis yra < 0,2 mikrometro, arba centrifugavimas, kuris yra labiausiai paplitęs būdas nuskaidrinti ląstelių nuolaužas, didelius arba mažus flokuliantus.

3 pavyzdys – Išvados

Naujai sukurta raiškos sistema apima genetinius elementus, skirtus tiksliniams baltymams gaminti ir kartu lizavimo fermentams gaminti kontroliuojamu būdu ląstelės periplazminėje erdvėje norimu augimo periodu, jei reikia. Eksperimentiniai duomenys parodė, kad koekspresuotas fago lizavimo fermentas nevisiškai suardo ląsteles, o formuoja protoplastų darinius, panašius į ląsteles. Tai leido manyti, kad lizocimo perkėlimas iš citoplazmos į periplazmą palengvino mureino sluoksnio, kuris yra atsakingas už ląstelių struktūros tvirtumo palaikymą, fermentinį skaidymą. Protoplastai atpalaiduoja/ sekretuoja tikslinius baltymus į auginimo terpę be sekrecijos lyderinių peptidų pagalbos, gaminant purtomose kolbose ir mikrobiologiniame bioreaktoriuje. Protoplastai išlieka gyvybingi po lizavimo fermentų indukcijos, t. y. jie *de novo* gamina ir išskiria dominantį baltymą, todėl laikui bėgant tikslinio baltymo kiekiai auginimo terpėje didėja.

MuLV-RT ekspresija Biostat A fermentatoriuje buvo atlikta naudojant *E. coli* JS007 pMuLV-RT-Km, pAra-pelB-gpe ląsteles. Buvo pademonstruotas ląstelės suardymo būdas, kurį užtikrina klonuoto T4 fago lizės geno raiška tam, kad būtų galima išskirti viduląstelinis tikslinius baltymus, ir kuris gali būti taikomas kitiems rekombinantiniams baltymams.

Vykdant rekombinantinių baltymų vienos talpos gamybos procesą fermentacijos inde su ląstelių autolize, po kurios seka baltymų stabilizavimas ir nukleorūgščių nusodinimas, buvo galima atsisakyti bent 5 atskirai atliekamų tolesnių apdorojimo etapų: ląstelių surinkimo, mechaninės ir (arba) fermentinės ląstelių lizės, ląstelių nuolaužų atskyrimo, nukleino nusodinimo, po kurio seka atskyrimas filtruojant arba centrifuguojant.

SekosMuLV-RT baltymo aminorūgščių seka:

mtlniedeherlhetskepdivslgstwlsdfpqawaetggmgglavrqapliiplkatstpv sikqyp
 msqearlgikphiqrllldqgilvpcqspwnptllpvkkgptndyrpvqdlrevnkrvedihptvpn
 pynllsglppshqwytvldldkdaaffclrlhptsqplfafewrdpemgisgqltwtrlpqgfknspt
 lfdealhrdladfrighpdlillqyvddlllaatseldcqqgtrallqtlgnlgyrasakkaqicq
 kvkylgyllkegqrwltearketvmgqptpkrqlreflgtagfcrllwipgfaemaaplypltk
 tgtlfnwgpddqkayqeikqalltapalglpdltkpfelfvdekqgyakgvltqklgpwrrpvayl
 skkl dpvaagwppclrmvaaiavltkdagklmgqplvilaphavealvkqppdrwlsnarmthyq
 allldtdrvqfgpvvalnpatllplpeeglqhncldilaeahgtrpdltdqplpdadhtwytdgss
 llqegqrkagaavtteteviwakalpagtsagraelialtqalkmaegkkl nvytdsryafatahi
 hgeiyrrrglltsegkeiknkdeilallkalflpkrllsiihcpghqkghsaeargnrmdaarka
 aitenpdtstlliensspnsrlin (SEQ ID NO:1)

Gpe baltymo seka su PelB signaline seka (NCBI referentinė seka: NP 049736.1,
 baltymo pavadinimas: glikozido hidrolazės šeimos baltymas [Escherichia fagas T4]. PelB
 signalinė seka: 1 - 22, T4 bakteriofago lizocimas 23 - 164):

Mkylptaaaglllllaaqparnarnniferlrlriderlrlkiykdttegyytigighlltkspslnaaks
 eldkaignrcngvitkdeaeklfndvdaavrgilrnaklkpydsldavrrcalinrnvfqrngetg
 vagftnslrrnlqqkrwdeaavnlaksiwynqtpnrakrvittftrgtwdayknl

(SEQ ID Nr. 2)

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Nuskaidrintos ląstelių kultūros, apimančios rekombinantinį baltymą, gamybos būdas, kur būdas apima:

i) bioreaktoriaus inokuliavimą ląstele šeimininke tam, kad būtų pateikta ląstelių kultūra, kur minėta ląstelė šeimininkė yra *Escherichia coli*, transformuota raiškos sistema, apimančia:

a) nukleorūgštį, koduojančią rekombinantinį baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, kur baltymas yra Molonio pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė (MMLV-RT); ir

b) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimo baltymą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekrecinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi,

ii) fermentavimą ląstelių kultūros, esant tokioms sąlygoms, kurios:

a) suteikia galimybę ekspresuoti rekombinantinį polipeptidą; ir

b) suteikia galimybę ląstelę padaryti pralaidžią tam, kad susiformuotų sferoplastas, išskiriantis rekombinantinį polipeptidą,

kur minėta fermentacijos pakopa apima stabilizuojančio agento įdėjimą į ląstelių kultūrą;

iii) nuskaidrinimą fermentuotos ląstelių kultūros, apimančios išskiriamą rekombinantinį baltymą, kur minėtas nuskaidrinimas apima:

a) flokuliavimo agento pridėjimą į ląstelių kultūrą, kur flokuliavimo agentas yra polietileniminas (PEI);

b) pirminį flokuliuotos ląstelių kultūros nuskaidrinimą, panaudojant pirmąjį nuskaidrinimo filtrą, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai apie 0,4 μm arba didesnes sulaikymo ribas, kur nuskaidrinimo pakopa neapima centrifugavimo.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas papildomai apima antrinę nuskaidrinimo pakopą, panaudojant antrąjį filtrą, kurio porų dydis užtikrina mažiausiai apie 0,22 μm sulaikymo ribas.

3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirminėje nuskaidrinimo pakopoje naudojamas pirmasis filtras, kurio porų dydis užtikrina sulaikymo ribas mažiausiai nuo maždaug 0,4 iki maždaug 0,8 μm .

4. Būdas pagal 2 arba 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad antrojoje nuskaidrinimo pakopoje naudojamas antrasis filtras, kurio porų dydis užtikrina sulaikymo ribas mažiausiai nuo maždaug 0,4 iki maždaug 0,8 μm arba mažiausiai nuo maždaug 1,0 iki maždaug 3,0 μm .

5. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirminė nuskaidrinimo pakopa ir (arba) antrinė nuskaidrinimo pakopa yra mikrofiltravimas, pasirinktinai kur mikrofiltravimas yra giluminis mikrofiltravimas.

6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mikrofiltravimas yra pasirinktas iš normalaus srauto filtravimo (NFF) arba tangentinio srauto filtravimo (TFF).

7. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nuskaidrintos ląstelių kultūros drumstumas yra mažesnis nei maždaug 20 NTU.

8. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas yra vykdomas uždaroje sistemoje taip, kad tarp bioreaktoriaus ir pirmojo bei antrojo nuskaidrinimo filtrų būtų palaikomas sterilus srautas.

9. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, papildomai apima pakopą, kurioje minėtai nuskaidrintai ląstelių kultūrai taikoma viena arba daugiau minėto rekombinantinio baltymo gryninimo pakopų.

10. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stabilizuojantis agentas apima sacharozę, Na_2SO_4 ir Brij 35, pasirinktinai 1 M sacharozę, 0,5 M Na_2SO_4 ir 0,5 % Brij 35.

11. Baltymų gamybos būdas, apimantis:

i. rekombinantinės *Escherichia coli* ląstelės kultivavimą esant sąlygoms, kurios:

a) suteikia galimybę ekspresuoti baltymą; ir

b) suteikia galimybę ląstelę padaryti pralaidžią tam, kad susiformuotų sferoplastas, kuris išskiria baltymą; ir

ii. baltymo išskyrimą iš kultūros be visiško rekombinantinės ląstelės lizavimo, kur ląstelė apima raiškos sistemą, apimančią:

a) nukleorūgštį, koduojančią baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, kur baltymas yra Molonio pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė (MMLV-RT); ir

b) nukleorūgštį, koduojančią T4 lizocimą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB sekretinį signalinį peptidą, funkcionaliai susietą su antruoju indukuojamu promotoriumi.

12. Būdas pagal bet kurį iš 1-11 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas neapima: (i) mechaninio ląstelių ardymo; (ii) egzogeninio fermento, kuris ardo ląstelės sienelę, pridėjimo; ir (iii) ląstelės transformavimo raiškos vektoriais, turinčiais nukleorūgštį, koduojančią egzogeninį fermentą, kuris ardo citoplazminę membraną.

13. Būdas pagal bet kurį iš 1-12 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nukleorūgštis, koduojanti baltymą, funkcionaliai susietą su pirmuoju indukuojamu promotoriumi, yra pirmajame konstrukte, ir nukleorūgštis, koduojanti T4 lizocimą rėmelyje su nukleorūgštimi, koduojančia PelB. sekretinį signalinį peptidą, yra antrajame konstrukte.

14. Būdas pagal bet kurį iš 1-13 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirmasis indukuojamas promotorius ir antrasis indukuojamas promotorius yra indukuojami nuosekliai.

15. Būdas pagal bet kurį iš 1-13 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirmasis indukuojamas promotorius ir antrasis indukuojamas promotorius yra indukuojami vienu metu.

16. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirmasis indukuojamas promotorius yra IPTG indukuojamas promotorius, pasirinktinai kur IPTG indukuojamas promotorius yra Ptac arba PT7.

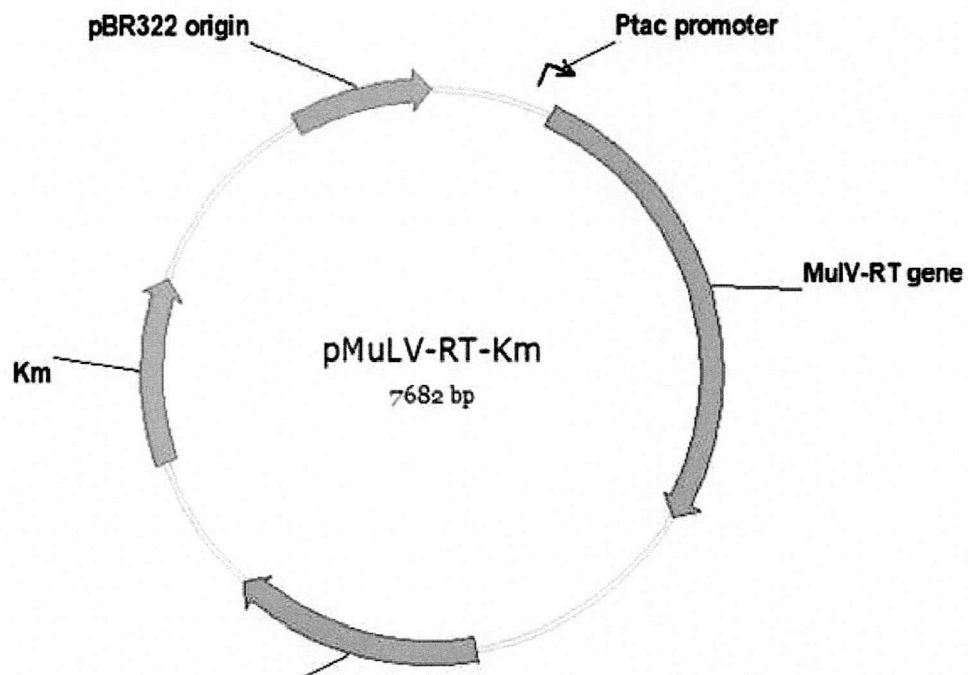
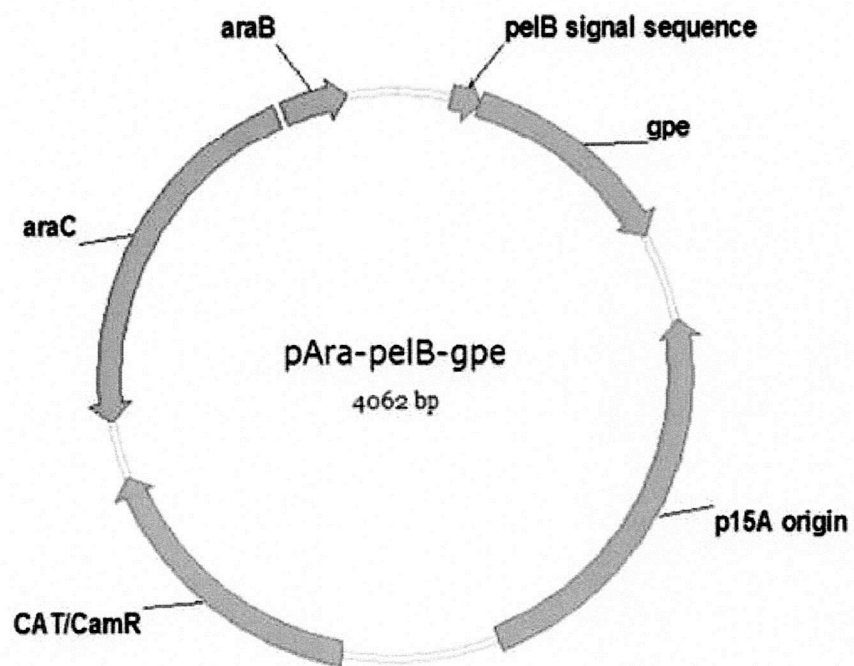
17. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad antrasis indukuojamas promotorius yra arabinozės indukuojamas promotorius, pasirinktinai kur arabinozės indukuojamas promotorius yra araB.

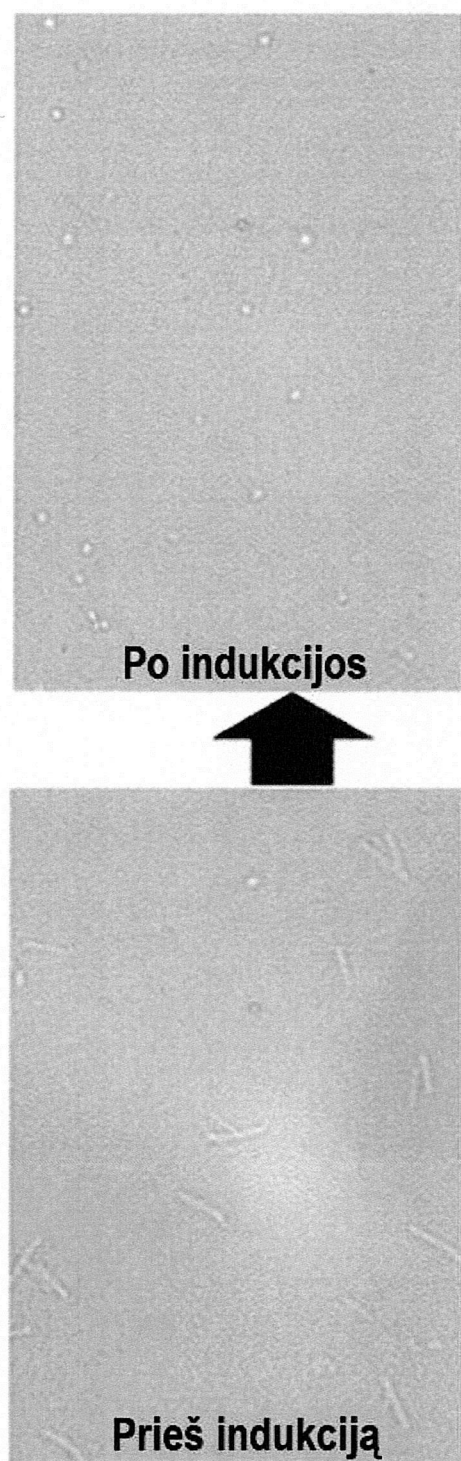
18. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad T4 lizocimo fermentą koduoja genas E.

19. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad *E. coli* yra *Escherichia coli* JS007 kamienas arba *Escherichia coli* B kamienas.

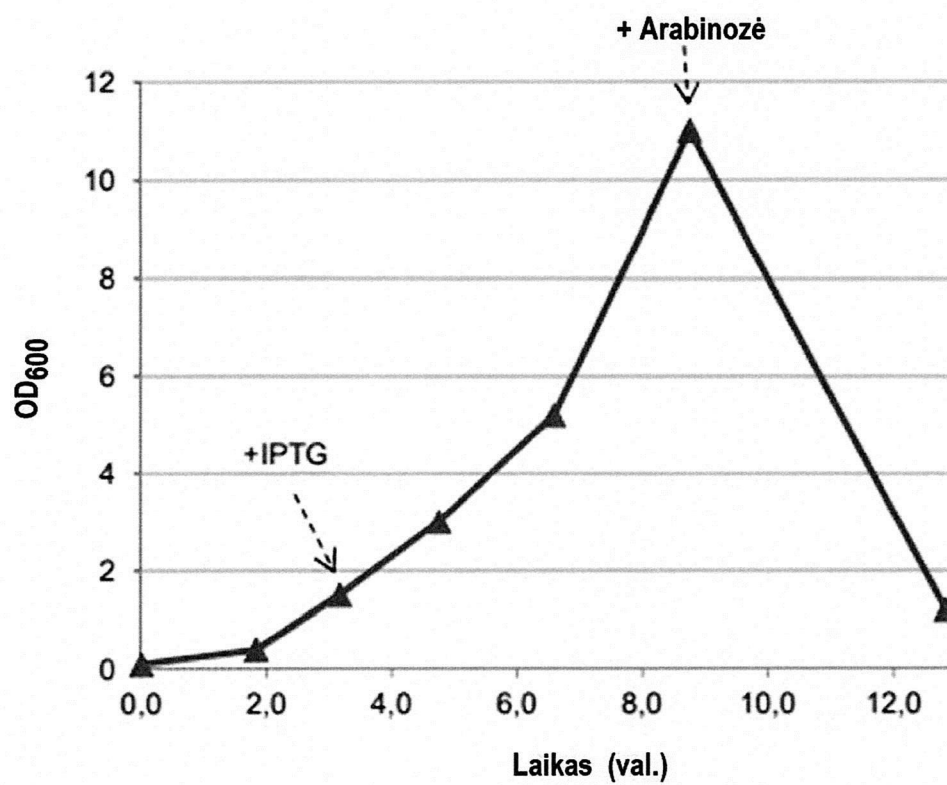
20. Būdas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentavimas arba kultivavimas apima pirmosios temperatūros pakeitimą į antrąją temperatūrą, pasirinktinai kur antroji temperatūra yra intervale nuo 25 °C iki 36 °C, o pirmoji temperatūra yra intervale nuo 36,8 °C iki 37,2 °C.

21. Rekombinantinis baltymas, pagamintas būdu pagal bet kurį iš 1-20 punktų.

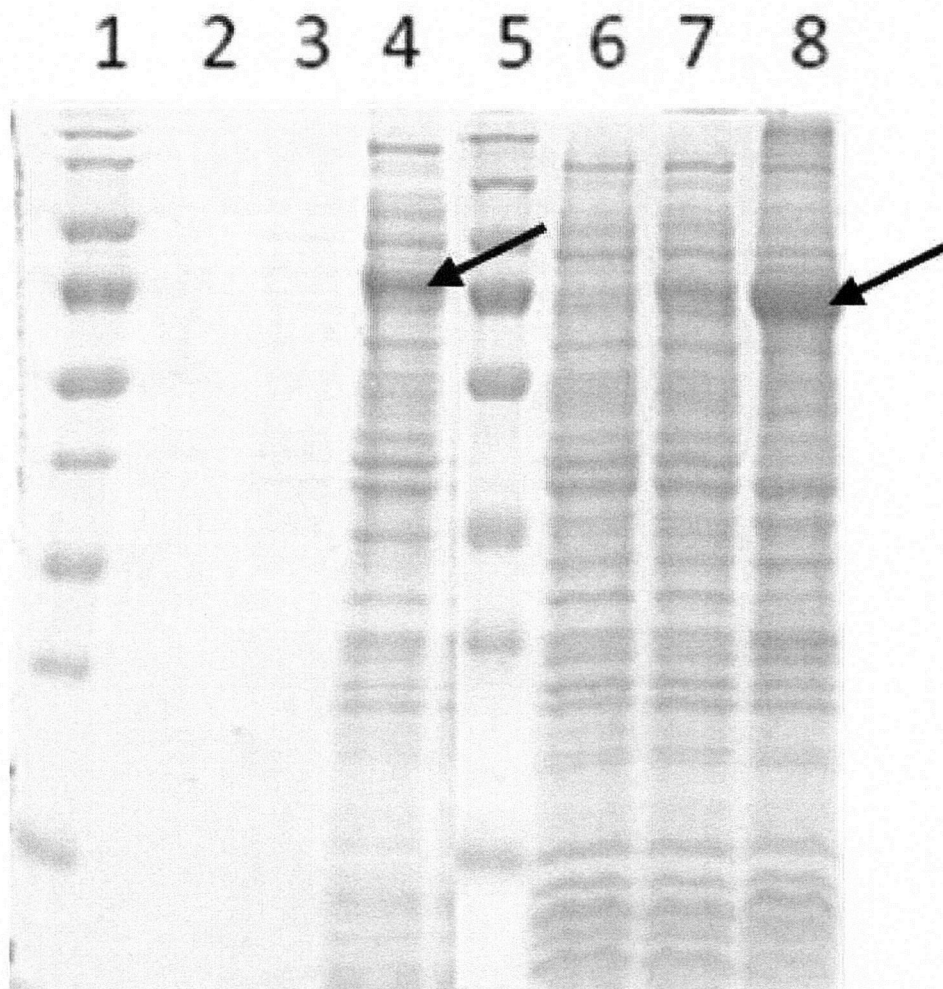
A**B**



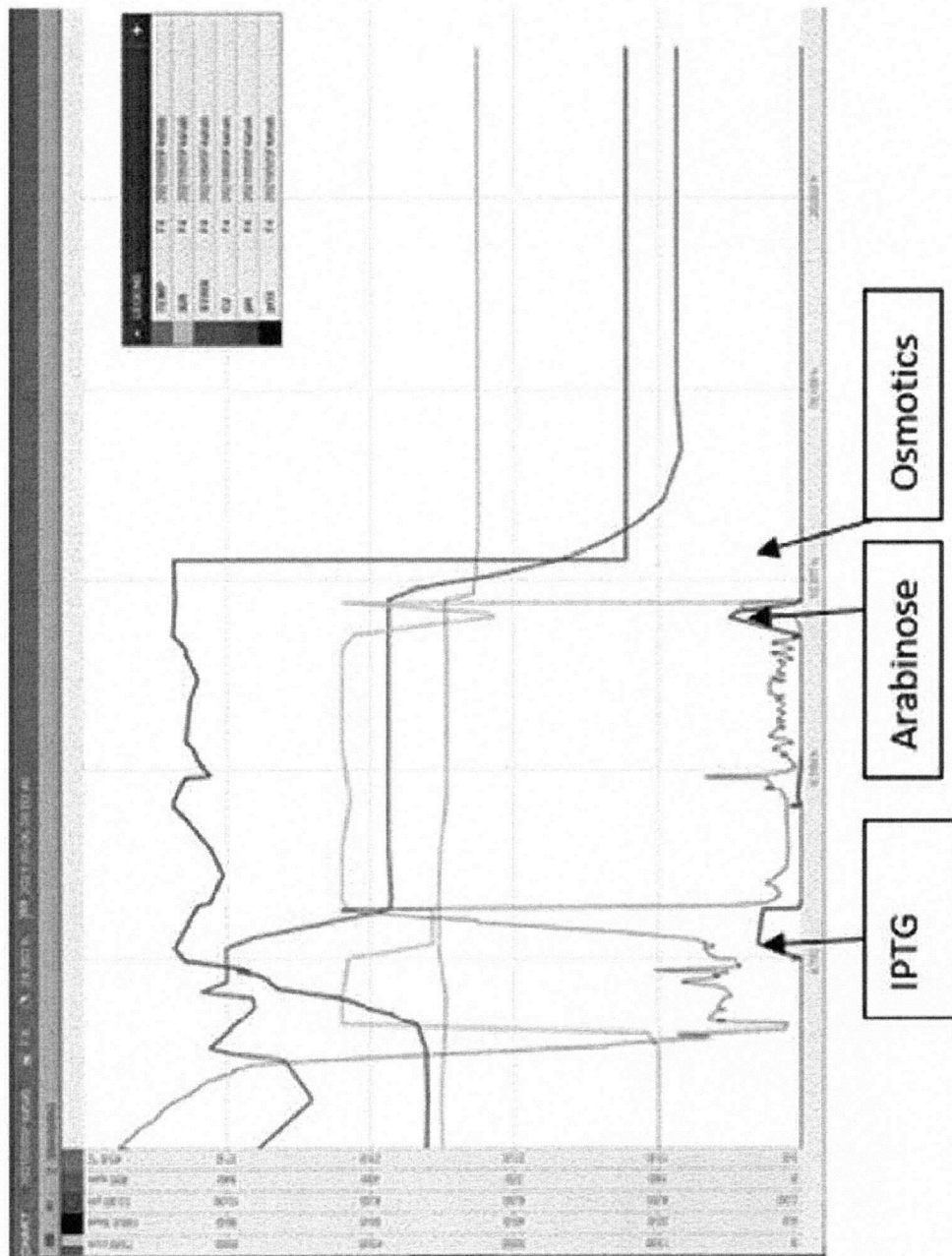
Pav. 2

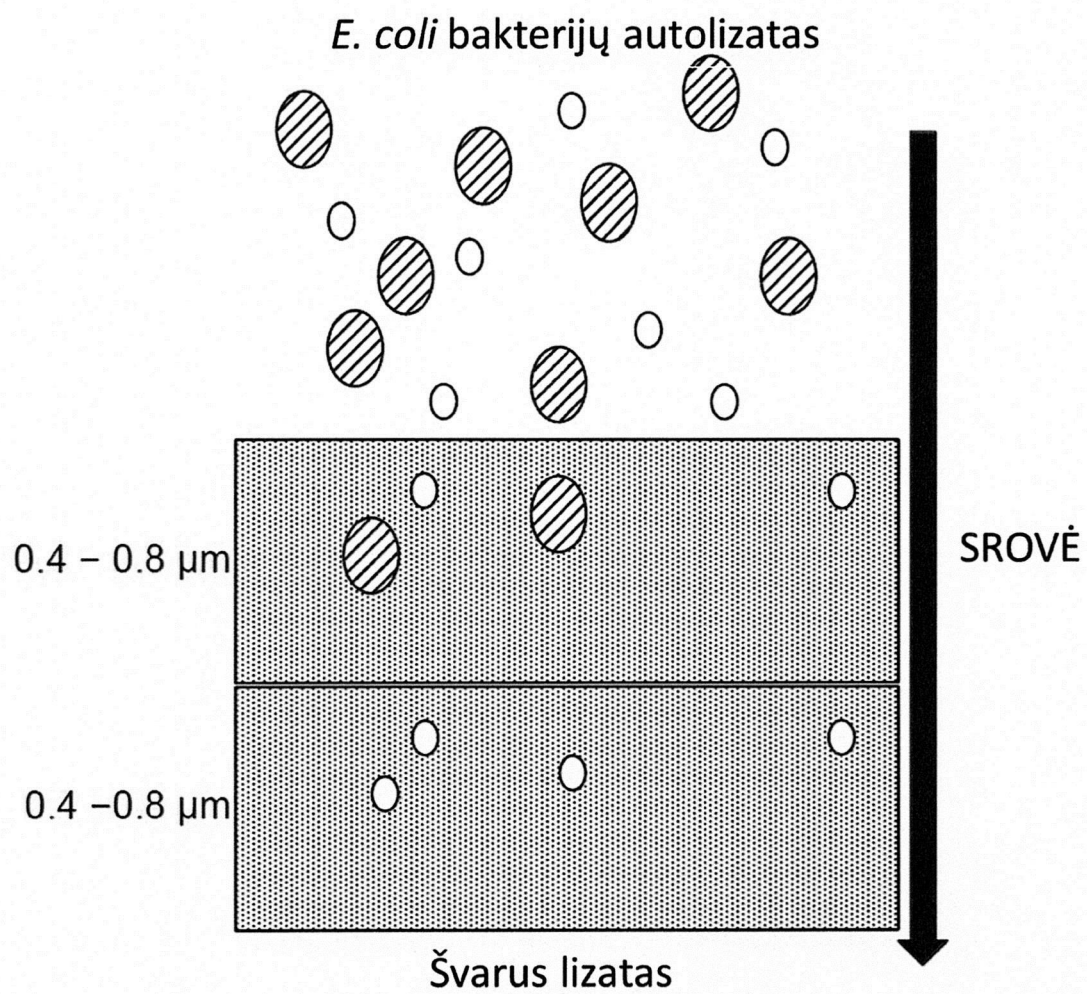


Pav. 3



Pav. 4





Pav. 7