

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391083** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.13**

(51) Int. Cl. *C12N 15/63* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.10.08**

(54) **СПОСОБ ПРОДУЦИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА В КЛЕТКЕ-ХОЗЯИНЕ, КОТОРАЯ ИМЕЕТ НАРУШЕННЫЙ МЕТАБОЛИЗМ РАМНОЗЫ, А ТАКЖЕ ЕГО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ВЕКТОРЫ, КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ**

(31) **20201096.3**

(32) **2020.10.09**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/077820**

(87) **WO 2022/074182 2022.04.14**

(71) Заявитель:

**ШТАДА АРЦНАЙМИТТЕЛЬ АГ  
(DE); ЭКСБРЕЙН БАЙОФАРМА АБ  
(SE)**

(72) Изобретатель:

**Викстрём Дэвид, Исмаил Нурзиан,  
Самуэльсон Патрик, Мирзадех  
Киаваш, Гудисе Сантош, Кадов  
Мария (SE), Сзекер Кэтлин (DE),  
Салих Тагрид, Барашкевич Мариуш,  
Башири Сиаваш (SE)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к конструкции ДНК, пригодной для экспрессии рекомбинантного белка в бактериальной клетке-хозяине, где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие промотор *ghaBAD*, активатор транскрипции *RhaR*, активатор транскрипции *RhaS*, маркер резистентности к антибиотику, промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, терминатор *gtnB T1*, терминатор *gtnB T2* и ориджин репликации *pMB1*. Конструкция ДНК также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный рекомбинантный белок, функционально связанный с промотором *ghaBAD*. Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору и бактериальной клетке-хозяину, содержащим указанную конструкцию ДНК, а также к способу продуцирования указанного рекомбинантного белка путем воздействия на указанную бактериальную клетку-хозяина рамнозой и тем самым индукции экспрессии указанного рекомбинантного белка.

**A1**

**202391083**

**202391083**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 577703EA/022

### **СПОСОБ ПРОДУЦИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА В КЛЕТКЕ-ХОЗЯИНЕ, КОТОРАЯ ИМЕЕТ НАРУШЕННЫЙ МЕТАБОЛИЗМ РАМНОЗЫ, А ТАКЖЕ ЕГО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ВЕКТОРЫ, КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ**

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к конструкции ДНК, пригодной для экспрессии рекомбинантного белка в бактериальной клетке-хозяине, где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие: промотор *rhaBAD*, активатор транскрипции *RhaR*, активатор транскрипции *RhaS*, маркер резистентности к антибиотику, по меньшей мере один терминатор и ориджин репликации. Конструкция ДНК также может содержать промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, и нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный рекомбинантный белок, функционально связанный с промотором *rhaBAD*. По меньшей мере один терминатор может представлять собой терминатор *trnB T1* и терминатор *trnB T2*. Рекомбинантный белок может представлять собой ранибизумаб. Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору и бактериальной клетке-хозяину, содержащей указанную конструкцию ДНК, а также к способу продуцирования указанного рекомбинантного белка путем воздействия на указанную бактериальную клетку хозяина рамнозой и тем самым индукции экспрессии указанного рекомбинантного белка.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Метаболизм рамнозы вовлекает поглощение клетками L-рамнозы пермеазой *RhaT*, а затем изомеризацию в L-рамнозу L-рамнозоизомеразой (*RhaA*), а затем L-рамнулоза фосфолирируется далее рамнулокиназой (*RhaB*) и, наконец, гидролизуется рамнулозо-1-фосфатальдозазой (*RhaD*) с образованием дигидроксиацетонфосфата и L-лактальдегида [1]. Гены *rhaA*, *rhaB* и *rhaD* образуют оперон, обозначаемый как *rhaBAD*, и транскрибируются с помощью промотора *rhaBAD* [1]. По сравнению с другими системами, каскад метаболизма рамнозы отличается тем, что для регуляции требуется два активатора транскрипции, известных как *RhaS* и *RhaR*, как объяснено ниже [1].

Оперон *rhaBAD* представляет собой катаболический оперон с положительной регуляцией, который транскрибирует вышеупомянутые гены *rhaB*, *rhaA* и *rhaD*, в отличие от оперона *rhaSR*, причем их соответствующие участки начала транскрипции разделяются приблизительно 240 п.н. ДНК [1]. Оперон *rhaSR* кодирует *RhaS* и *RhaR*, где каждый мономер димерных белков *RhaS* и *RhaR* содержит два мотива спираль-поворот-спираль и контактирует с двумя большими бороздками ДНК. *RhaR* регулирует транскрипцию *rhaSR* посредством связывания промоторной ДНК, охватывающей основания с -32 по -82 относительно участка начала транскрипции *rhaSR* [1]. После экспрессии *rhaSR* *RhaS* связывает ДНК выше оперона *rhaBAD* в основаниях с -32 по -81 относительно участка

начала транскрипции, повышая экспрессию *rhaBAD* [1]. Более того, межгенная область *rhaSR-rhaBAD* содержит участок связывания CRP в положении -92,5 (CRP 1) относительно участка начала транскрипции оперона *rhaBAD* и участка связывания CRP в положениях -92,5 (CRP 2), -115,5 (CRP 3) и -116,5 (CRP 4) относительно участка начала транскрипции оперона *rhaSR* [1]. Белок-рецептор циклического АМР (CRP) регулирует экспрессию более чем 100 промоторов в *Escherichia coli*.

Конструкции ДНК, содержащие последовательности ДНК, кодирующие *RhaS*, *RhaR*, и промотор *rhaBAD* известны в данной области. В US8138324 описаны плазмиды, происходящие из *pTACO* и *pLEMO* (т.е. конструкции ДНК), содержащие последовательности ДНК, кодирующие *RhaS*, *RhaR* и промотор *rhaBAD*. Однако в US8138324 не описано применение клеток-хозяев, которые имеют нарушенный метаболизм рамнозы.

Также в данной области известны конструкции ДНК на основе происходящих из *pRha* плазмид, содержащих последовательности ДНК, кодирующие *RhaS*, *RhaR* и промотор *rhaBAD*, например, из Giacalone et al. [5] или Hjelm et al. [2]. В Giacalone et al. описаны, например, плазмиды *pRha67A* и *pRha109A*, в то время как в Hjelm et al. описана плазида *pRha67K*.

Хотя в данной области известны конструкции ДНК, содержащие последовательности ДНК, кодирующие *RhaS*, *RhaR* и промотор *rhaBAD*, все еще существует множество проблем, особенно при продуцировании рекомбинантных белков в промышленном масштабе, в частности, моноклональных антител или их фрагментов. Основными проблемами являются:

- (i) клетки-хозяева подвергаются стрессу, что приводит к повреждению клеточных макромолекул, таких как мембраны, белки и нуклеиновые кислоты;
- (ii) плохой рост клеток-хозяев;
- (iii) низкая активность продуцированных рекомбинантных белков; и/или
- (iv) получение рекомбинантных белков с низким выходом.

Таким образом, существует потребность в улучшенных конструкциях ДНК, а также в клетке-хозяине и способе, пригодных для эффективного продуцирования рекомбинантных белков, таких как моноклональные антитела или их фрагменты, с высоким выходом, в частности, когда такие рекомбинантные белки предназначены для терапевтических применений.

#### ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, задачей настоящего изобретения было предоставление улучшенных конструкций ДНК, а также бактериальной клетки-хозяина и способа, пригодного для эффективного продуцирования рекомбинантных белков, таких как моноклональные антитела или их фрагменты, в рекомбинантной клетке-хозяине с высоким выходом, в частности, когда такие рекомбинантные белки предназначены для терапевтических применений. Рекомбинантный белок может представлять собой ранибизумаб.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первый аспект изобретения относится к конструкции ДНК для экспрессии ранибизумаба в бактериальной клетке-хозяине, где ранибизумаб содержит (i) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 3, и (ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 4, где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ранибизумаб, где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая функционально связана в направлении транскрипции с нуклеотидной последовательностью, кодирующей легкую цепь ранибизумаба и/или тяжелую цепь ранибизумаба, где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- промотор rhaBAD,
- активатор транскрипции RhaR,
- активатор транскрипции RhaS,
- маркер резистентности к антибиотику,
- по меньшей мере один терминатор, и
- ориджин репликации pMB1.

В предпочтительном варианте осуществления указанная конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие терминатор rnlB T1 и терминатор rnlB T2.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК характеризуется следующим:

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, предпочтительно маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с ней;
- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор AmpR, предпочтительно промотор AmpR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;
- терминатор rnlB T1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;
- терминатор rnlB T2, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 15

или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; и/или

- ориджин репликации рМВ1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК характеризуется следующим:

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор AmpR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;

- терминатор *trnB* T1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

- терминатор *trnB* T2, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 15;

и/или

- ориджин репликации рМВ1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК характеризуется следующим:

- промотор *ghaBAD*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% последовательностью с ней;

- активатор транскрипции RhaR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 9 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- активатор транскрипции RhaS, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- промотор AmpR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор *trnB* T1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор *trnB* T2, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; и

- ориджин репликации рМВ1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК характеризуется следующим:

- промотор rhaBAD, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 8;
- активатор транскрипции RhaR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 9;
- активатор транскрипции RhaS, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 11;
- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;
- промотор AmpR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;
- терминатор rrmB T1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;
- терминатор rrmB T2, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 15; и
- ориджин репликации рМВ1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК содержит участок множественного клонирования, содержащий 17 участков рестрикции, расщепляемых ферментами рестрикции EcoRI, NdeI, NotI, XhoI, PspXI, PaeR71, BbsI, StyI, AvrII, BanI, Acc65I, KpnI, Eco53kI, SacI, BamHI, XbaI, SalI, AccI, PstI, SbfI, SphI и HindIII.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 1, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 1.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, функционально связана с промотором rhaBAD.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней. В следующем предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6.

В одном из вариантов осуществления нуклеотидная последовательность,

кодирующая сигнальный пептид, функционально связана в направлении транскрипции либо с одной, либо с обеими из нуклеотидных последовательностей SEQ ID 5 и SEQ ID 6.

В одном из вариантов осуществления сигнальный пептид представляет собой PelB (пектатлиаза В). В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; более предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7.

В одном варианте осуществления полученный сигнальный пептид PelB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID 18 [6]: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAWA.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция ДНК содержит последовательность SEQ ID 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно содержит последовательность SEQ ID 17.

Второй аспект изобретения относится к экспрессирующему вектору, содержащему любую из конструкций ДНК согласно первому аспекту изобретения.

Третий аспект изобретения относится к бактериальной клетке-хозяину, содержащей конструкцию ДНК согласно первому аспекту изобретения или экспрессирующий вектор согласно второму аспекту изобретения, где указанная бактериальная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку *Escherichia coli*, более предпочтительно клетку *E. coli* K-12.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин содержит (i) хромосому, которая содержит мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты гена *rhaB*, которая инактивирует *RhaB*, или (ii) хромосому, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая *RhaB*, делетирована.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, предпочтительно содержащую хромосому, которая содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей *RhaB*.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, содержащую хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 2, где необязательно хромосома бактериальной клетки-хозяина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую *RhaT*.

Четвертый аспект изобретения относится к способу продуцирования ранибизумаба, включающему стадию воздействия на бактериальную клетку-хозяина согласно третьему аспекту изобретения рамнозой, тем самым индуцируя экспрессию ранибизумаба. В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию

выделения ранибизумаба из бактериальной клетки-хозяина; и необязательно дополнительно включает одну или несколько стадию(й) очистки выделенного ранибизумаба, предпочтительно посредством одной или нескольких стадий хроматографии.

Пятый аспект изобретения относится к способу продуцирования ранибизумаба, включающему следующие стадии:

клонирование нуклеотидной последовательности, кодирующей рекомбинантный белок, в конструкцию ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 1 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 1, так чтобы нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ранибизумаб, была функционально связана с промотором *rhaBAD*; и

а. введение полученной нуклеотидной последовательности в бактериальную клетку-хозяина, содержащую хромосому, которая содержит мутацию или модификацию, которая нарушает метаболизм рамнозы.

В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию воздействия на бактериальную клетку-хозяина рамнозой, тем самым индуцируя экспрессию рекомбинантного белка.

В другом варианте осуществления способ дополнительно включает стадию выделения ранибизумаба из бактериальной клетки-хозяина; и необязательно дополнительно включает одну или несколько стадию(й) очистки выделенного ранибизумаба, предпочтительно посредством одной или нескольких стадий хроматографии.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli*, более предпочтительно клетку *E. coli* K-12, наиболее предпочтительно клетку *E. coli* W3110.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин содержит либо (i) хромосому, которая содержит мутацию в нуклеотидной последовательности гена *rhaB*, которая инактивирует *RhaB*, либо (ii) хромосому, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая *RhaB*, делетирована.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli* W3110, содержащую хромосому, которая содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей *RhaB*.

В предпочтительном варианте осуществления указанная бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli* W3110, содержащую хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 2, где необязательно хромосома бактериальной клетки-хозяина дополнительно содержит нуклеотидную



последовательность, кодирующую RhaT.

В предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; предпочтительно указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный белок, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, содержащая SEQ ID 5 и/или SEQ ID 6, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая функционально связана в направлении транскрипции с нуклеотидной последовательностью SEQ ID 5 и/или SEQ ID 6.

В предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид PelB, предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7 и слита с нуклеотидной последовательностью, кодирующей легкую цепь и/или тяжелую цепь ранибизумаба.

В предпочтительном варианте осуществления полученная нуклеотидная последовательность, подлежащая введению в бактериальную клетку, содержит последовательность SEQ ID 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно содержит последовательность SEQ ID 17.

Шестой аспект изобретения относится к бактериальной клетке-хозяину, представляющей собой клетку *E. coli* W3110 и содержащей хромосому, которая содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей RhaB. В одном из вариантов осуществления указанная клетка-хозяин *E. coli* W3110 содержит хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 2. В следующем варианте осуществления хромосома бактериальной клетки-хозяина

содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую RhaT.

Одна или несколько из указанных выше SEQ ID 1-18 различных аспектов изобретения (и их вариантов осуществления) может быть заменена последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней. Термин "идентичностью последовательностей", как используют в рамках изобретения, используют в отношении аминокислотных или нуклеотидных последовательностей, и идентичность последовательностей представляет собой идентичность на протяжении всей длины указанной последовательности. Таким образом, последовательность может быть по меньшей мере на 90 процентов, по меньшей мере на 92 процента, по меньшей мере на 95 процентов, по меньшей мере на 96 процентов, по меньшей мере на 97 процентов, по меньшей мере на 98 процентов или по меньшей мере на 99 процентов идентична указанной аминокислотной или нуклеотидной последовательности. Таким образом, такие последовательности по изобретению включают единичные или множественные изменения нуклеотидов или аминокислот (вставки, замены, инсерции или делеции) в последовательностях по изобретению. На уровне аминокислот предпочтительные последовательности с определенной выше идентичностью последовательностей содержат вплоть до 5, например, только 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно 1, 2 или 3, более предпочтительно 1 или 2, измененных аминокислот относительно последовательностей по изобретению.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1 - Карта плазмиды для KTXHIS,

Фиг.2 - Нуклеотидная последовательность участка множественного клонирования (MCS) KTXHIS,

Фиг.3 - Карта плазмиды KTXHIS-PelbLC-PelbHC,

Фиг.4а-4d - Вестерн-блоты с использованием антитела против FAB - сравнение титруемости в мелкомасштабных экспериментах.

Фиг.5 - Очистка мелкомасштабной партии из осветленных гомогенизированных образцов лизатов из собранного материала со смолой Capto L. Вестерн-блот с использованием антитела против FAB. Загрузка геля: вносили 3 мкг продукта за исключением XB17/67A (вносили только 0,2 мкг продукта вследствие низкого выхода). Маркер: 18,4-116 кДа.

Фигура 6 - Обобщение данных титрования с использованием аффинной ВЭЖХ.

Фигуры 7а-7с - Вестерн-блоты с использованием антитела против FAB - Сравнение контролей экспрессии в мелкомасштабном эксперименте.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к регуляции продуцирования рекомбинантных белков на основе промотора L-рамнозы rhaBAD.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к продуцированию рекомбинантного белка, предпочтительно ранибизумаба, включающему стадии:

а. клонирования нуклеотидной последовательности, кодирующей рекомбинантный

белок, предпочтительно ранибизумаб, в конструкцию ДНК, так чтобы нуклеотидная последовательность была функционально связана с промотором rhaBAD, и

в. введения полученной нуклеотидной последовательности в бактериальную клетку-хозяина, содержащую хромосому, которая содержит мутацию или модификацию, которая нарушает метаболизм рамнозы.

Конструкция ДНК, описанная в вышеуказанном способе, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор rhaBAD. В одном из вариантов осуществления изобретения, нуклеотидная последовательность промотора rhaBAD содержит последовательность SEQ ID 8 (и где последовательность обозначается как "rhaBAD" на фиг.1 и 3):

CACCACAATTCAGCAAATTGTGAACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGC  
CAATGGCCCATTTTCTTGTTCAGTAACGAGAAGGTCGCGAATCCAGGCGCTTTTTAGA  
CTGGTCGTA.

Конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую активатор транскрипции RhaR. В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеотидная последовательность активатора транскрипции RhaR содержит последовательность SEQ ID 9 (и где последовательность обозначена как "rhaR" на фиг.1 и 3):

ATGGCTTTCTGCAATAACGCGAATCTTCTCAACGTATTTGTACGCCATATTGC  
GAATAATCAACTTCGTTCTCTGGCCGAGGTAGCCACGGTGGCGCATCAGTTAAAACT  
TCTCAAAGATGATTTTTTTGCCAGCGACCAGCAGGCAGTCGCTGTGGCTGACCGTTA  
TCCGCAAGATGTCTTTGCTGAACATACACATGATTTTTGTGAGCTGGTGATTGTCTG  
GCGCGGTAATGGCCTGCATGTACTCAACGATCGCCCTTATCGCATTACCCGTGGCGA  
TCTCTTTTACATTCATGCTGATGATAAACACTCCTACGCTTCCGTTAACGATCTGGTT  
TTGCAGAATATTATTTATTGCCCGGAGCGTCTGAAGCTGAATCTTGACTGGCAGGGG  
GCGATTCCGGGATTTAACGCCAGCGCAGGGCAACCACACTGGCGCTTAGGTAGCAT  
GGGGATGGCGCAGGCGCGCAGGTTATTGGTCAGCTTGAGCATGAAAGTAGTCAGC  
ATGTGCCGTTTGCTAACGAAATGGCTGAGTTGCTGTTCCGGGCAGTTGGTGATGTTGC  
TGAATCGCCATCGTTACACCAGTGATTCGTTGCCGCCAACATCCAGCGAAACGTTGC  
TGGATAAGCTGATTACCCGGCTGGCGGCTAGCCTGAAAAGTCCCTTTGCGCTGGATA  
AATTTTGTGATGAGGCATCGTGCAGTGAGCGCGTTTTTTCGTCAGCAATTCGCCAGC  
AGACTGGAATGACCATCAATCAATATCTGCGACAGGTCAGAGTGTGTCATGCGCAA  
TATCTTCTCCAGCATAGCCGCCTGTTAATCAGTGATTTTCGACCGAATGTGGCTTTG  
AAGATAGTAACTATTTTTCGGTGGTGTTTACCCGGGAAACCGGGATGACGCCAGCC  
AGTGGCGTCATCTCAATTCGCAGAAAGAT.

Конструкция ДНК может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую удлинение активатора транскрипции RhaR, которое находится рамке считывания с RhaR, вследствие отсутствующего стоп-кодона. В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеотидная последовательность удлинения активатора транскрипции RhaR содержит последовательность SEQ ID 10 (и где

последовательность обозначается как "rhaR удлинённый" на фиг.1 и 3):  
AGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAG.

Конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую активатор транскрипции RhaS. В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеотидная последовательность активатора транскрипции RhaS содержит последовательность SEQ ID 11 (и где последовательность обозначается как "rhaS" на фиг.1 и 3):

ATGACCGTATTACATAGTGTGGATTTTTTCCGTCTGGTAACGCGTCCGTGGCGATA  
GAACCCCGGCTCCCGCAGGCGGATTTTCCTGAACATCATCATGATTTTCATGAAATT  
GTGATTGTCTGAACATGGCACGGGTATTCATGTGTTTAATGGGCAGCCCTATACCATC  
ACCGGTGGCACGGTCTGTTTCGTACGCGATCATGATCGGCATCTGTATGAACATAACC  
GATAATCTGTGTCTGACCAATGTGCTGTATCGCTCGCCGGATCGATTTTCAGTTTCTCG  
CCGGGCTGAATCAGTTGCTGCCACAAGAGCTGGATGGGCAGTATCCGTCTCACTGGC  
GCGTTAACCACAGCGTATTGCAGCAGGTGCGACAGCTGGTTGCACAGATGGAACAG  
CAGGAAGGGGAAAATGATTTACCCTCGACCGCCAGTCGCGAGATCTTGTTTATGCA  
ATTACTGCTCTTGCTGCGTAAAAGCAGTTTGCAGGAGAACCTGGAAAACAGCGCAT  
CACGTCTCAACTTGCTTCTGGCCTGGCTGGAGGACCATTTTGCCGATGAGGTGAATT  
GGGATGCCGTGGCGGATCAATTTTCTCTTTCCTACTGCGTACGCTACATCGGCAGCTTA  
AGCAGCAAACGGGACTGACGCCTCAGCGATACCTGAACCGCCTGCGACTGATGAAA  
GCCCGACATCTGCTACGCCACAGCGAGGCCAGCGTACTGACATCGCCTATCGCTGT  
GGATTCAGCGACAGTAACCACTTTTCGACGCTTTTTCGCCGAGAGTTTAACTGGTCA  
CCGCGTGATATTCGCCAGGGACGGGATGGCTTTCTGCAATAA.

Конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую "маркер резистентности к антибиотику" или "селективный маркер". Такой маркер представляет собой фрагмент ДНК, который содержит ген, продукт которого сообщает резистентность к антибиотику (например, хлорамфеникол, ампициллин, гентамицин, стрептомицин, тетрациклин, канамицин, неомицин) или способность расти на селективной среде (например, ura (урацил), leu (лейцин), trp (триптофан), his (гистидин)). Обычно плазмиды содержат маркер резистентности к антибиотику, чтобы обеспечить сохранение бактериальными клетками плазмиды. В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность маркера резистентности к канамицину. В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность для сообщения резистентности к канамицину содержит последовательность SEQ ID 12 (и где последовательность обозначается как "KanR" на фиг.1 и 3):

ATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCA  
ACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCTGGGCAATCAG  
GTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAAC  
ATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGG  
CTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTA CTCTGATGATG

CATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAA  
 TATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTCTGCGCCGGTTG  
 CATTCGATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGTCTCGTC  
 AGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAG  
 CGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTC  
 TCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACG  
 AGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAC  
 CAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTCGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAA  
 CGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATT  
 TGATGCTCGATGAGTTTTTTCTAA.

Конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер резистентности к антибиотику. Такой маркер может увеличивать экспрессию маркеров резистентности к антибиотику, описанных в предшествующем абзаце. В одном из вариантов осуществления изобретения промотор для резистентности к ампициллину представляет собой промотор AmpR, который не только способен обеспечивать экспрессию маркеров резистентности к ампициллину, но также способен обеспечивать экспрессию маркеров резистентности к канамицину. В конкретном варианте осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты промотора AmpR содержит последовательность SEQ ID 13 (и где последовательность обозначается как "промотор AmpR" на фиг.1 и 3):

CGCGGAACCCSTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC  
 ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT.

Конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один терминатор. Конструкция ДНК может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую как терминатор *trnB* T1, так и терминатор *trnB* T2. Оба из терминаторов *trnB* T1 и T2 являются эффективными терминаторами транскрипции по отдельности, однако при совместном использовании терминаторы *trnB* T1 и T2 могут более эффективно терминировать транскрипцию.

В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность терминатора *trnB* T1 содержит последовательность SEQ ID 14:

CAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTT  
 GTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAT

В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность терминатора *trnB* T2 содержит последовательность SEQ ID 15:

AGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT.

Кроме того, конструкция ДНК может содержать ориджин репликации, который представляет собой конкретную нуклеотидную последовательность, в которой иницируется репликация ДНК. Репликация ДНК может происходить от этой точки в двух направлениях или в одном направлении. Некоторыми часто используемыми

ориджинами репликации являются ColE1, pMB1, pSC101, R6K, pBR322, R6K, p15A и pUC. В одном из вариантов осуществления изобретения ориджин репликации представляет собой pMB1 или его производные. В конкретном варианте осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты pMB1 содержит последовательность SEQ ID 16:

TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGT  
 CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG  
 CTCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCSTTT  
 CTCCTTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCG  
 GTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGAC  
 CGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA  
 TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG  
 TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT  
 TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG  
 ATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGAT  
 TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA.

В альтернативном варианте осуществления изобретения конструкция ДНК представляет собой экспрессирующую плазмиду, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одно или несколько из:

- промотора rhaBAD,
- активатора транскрипции RhaR,
- активатора транскрипции RhaS,
- маркера резистентности к антибиотику,
- по меньшей мере одного терминатора и
- ориджина репликации,

где конструкция ДНК необязательно содержит участок множественного клонирования, содержащий 17 участков рестрикции, расщепляемых ферментами рестрикции EcoRI, NdeI, NotI, XhoI, PspXI, PaeR71, BbsI, StyI, AvrII, BanI, Acc65I, KpnI, Eco53kI, SacI, BamHI, XbaI, Sall, AccI, PstI, SbfI, SphI и HindIII. Необязательно, конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, и/или нуклеотидными последовательностями, кодирующими терминатор trnB T1 и терминатор trnB T2.

В одном из вариантов осуществления изобретения описанная выше экспрессирующая плазида содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую:

- промотор rhaBAD,
- активатор транскрипции RhaR,
- активатор транскрипции RhaS,
- маркер резистентности к антибиотику,
- по меньшей мере один терминатор и

- ориджин репликации.

Необязательно, конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, и/или нуклеотидные последовательности, кодирующие терминатор *trnB T1* и терминатор *trnB T2*.

В одном из вариантов осуществления изобретения описанная выше экспрессирующая плаزمиды содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую:

- промотор *rhaBAD*,
- активатор транскрипции *RhaR*,
- активатор транскрипции *RhaS*,
- маркер резистентности к канамицину,
- промотор *AmpR*,
- по меньшей мере один терминатор и
- ориджин репликации *pMB1*.

Необязательно, нуклеотидная последовательность, кодирующая промотор *AmpR*, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к канамицину, и/или конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие терминатор *trnB T1* и терминатор *trnB T2*.

В одном из вариантов осуществления изобретения описанная выше экспрессирующая плазмиды содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- промотор *rhaBAD*? содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 8,
- активатор транскрипции *RhaR*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 9,
- активатор транскрипции *RhaS*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 11,
- маркер резистентности к канамицину содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12,
- промотор *AmpR*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13,
- терминатор *trnB T1*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 14,
- терминатор *trnB T2*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 15, и
- ориджин репликации *pMB1*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция ДНК представляет собой плазмиду, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 1, и где указанная конструкция ДНК также обозначается как КТХН1S в настоящем описании.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный белок, подлежащий клонированию в конструкции ДНК, описанные выше, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его фрагмент,

предпочтительно ранибизумаб или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая ранибизумаб, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую и легкую цепи ранибизумаба. Ранибизумаб представляет собой фрагмент моноклонального антитела (Fab), являющийся антиангиогенным, который одобрен для лечения "влажного" типа старческой дегенерации желтого пятна, распространенной формы связанного со старением ухудшения зрения.

В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь ранибизумаба, содержит последовательность SEQ ID 6:

GAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCC  
 TCGTCTGAGCTGTGCAGCAAGCGGTTATGATTTTACCCATTATGGTATGAATTGGG  
 TTCGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGGTGGATTAATACCTATACCG  
 GTGAACCGACCTATGCAGCAGATTTTAAACGTCGTTTTACCTTTAGCCTGGATACCA  
 GCAAAGCACCGCATATCTGCAGATGAATAGCCTGCGTGCAGAGGATACCGCAGTG  
 TATTATTGTGCAAAATATCCGTATTATTACGGCACCAGCCATTGGTATTTTCGATGTTT  
 GGGGTCAGGGCACCTGGTTACCGTTAGCAGCGCAAGCACCAAAGGTCCGAGCGTT  
 TTCCGCTGGCACCGAGCAGCAAAAGTACCAGCGGTGGCACCGCAGCACTGGGTTG  
 TCTGGTTAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGTGCACT  
 GACCAGCGGTGTTACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCGGTCTGTATAGCCT  
 GAGCAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGTAA  
 TGTTAATCATAAACCGAGCAATACCAAAGTGGATAAAAAAGTGGAACCGAAAAGCT  
 GCGATAAAACCCATCTGTAA.

В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь ранибизумаба, содержит последовательность SEQ ID 5:

GATATTCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCAAGCGTTGGTGATC  
 GTGTTACCATTACCTGTAGCGCAAGCCAGGATATTAGCAATTATCTGAATTGGTATC  
 AGCAGAAACCGGGTAAAGCACCGAAAGTGCTGATCTATTTTACCAGCAGCCTGCAT  
 AGCGGTGTTCCGAGCCGTTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGATTTTACCCTGACC  
 ATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCAACCTATTATTGTCAGCAGTATAGCACC  
 GTTCCGTGGACCTTTGGTCAGGGCACCAAAGTTGAAATTAACGTACCGTTGCAGCA  
 CCGAGCGTTTTTATCTTTCCGCCTAGTGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCAAGC  
 GTTGTGTTGTCTGCTGAATAACTTTTATCCGCGTGAAGCAAAAGTTCAGTGGAAGTT  
 GATAATGCACTGCAGAGCGGTAATAGCCAAGAAAGCGTTACCGAACAGGATAGCAA  
 AGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGATTATGAAA  
 AACACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCAGTCCGGTTACC  
 AAAAGTTTTAATCGTGGTGAATGCTAA.

В следующем варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и легкую цепи ранибизумаба, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, функционально



связанный с любой или обеими из нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелую и легкую цепи ранибизумаба. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный пептид, может представлять собой нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид PelB. В конкретном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7:

ATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAGCAC  
AGCCTGCAATGGCA.

Полученная нуклеотидная последовательность (т.е. продукт клонирования нуклеотидной последовательности, кодирующей рекомбинантный белок, предпочтительно ранибизумаб, в конструкцию ДНК) предпочтительно представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID 17, которая также обозначается как KTXHIS-PelbLC-PelbHC в настоящем описании.

Бактериальная клетка-хозяин для применения для продуцирования рекомбинантного белка содержит хромосому, имеющую мутацию или модификацию, которая нарушает метаболизм рамнозы. Бактериальная клетка-хозяин может представлять собой клетку *E. coli*. В предпочтительном варианте осуществления бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli* K-12, более предпочтительно бактериальная клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli* W3110. Нарушения метаболизма рамнозы достигают посредством мутации в нуклеотидной последовательности, кодирующей RhaB, которая инактивирует RhaB. Альтернативно нарушенного метаболизма рамнозы достигают с использованием бактериальной клетки-хозяина, имеющей хромосому, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая RhaB, делетирована; этого, например, можно достигать путем делеции нуклеотидной последовательности, кодирующей RhaB. Предпочтительно, хромосома бактериальной клетки-хозяина содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую RhaT, т.е. ген RhaT является интактным.

В одном из вариантов осуществления изобретения нарушения метаболизма рамнозы достигают посредством мутации со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей RhaB. Такая мутация приводит к бактериальной клетке-хозяину, имеющей хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2:

GTTGGCCCCGCTCCACGCCAGTAGCGACTCGTCCCAGTCGTCGCTATTGATAT  
TGACCAGTTGCGTGGTCGTGGCGTTGGTATATTCCCAGTTCATCTTGCCGGTCAGGC  
GATAACTGAAGTAATCCGGCATCAGCAGAGCGTGAGCAATGTGTGGAATAAGTTCA  
GGTTGTTGCTCCGTCAGCGCACGCAACTGATAAAGCGTATTGAAGGGCAGAACTG  
GATGCCGCTACGTTGATAAATATCGCGTTTGCCGAGTTGTTGTTGTGCCTGCGCCATT  
AGGCCATTGGTGCGGCTATCGCGATAAGCAACGGGCAGGCCACACGCTGACCCTG  
TTGGTTCGAGCAGCACAAAGTCCACGCCCCAGGTATCAATCCCAATGCTATCGCGATA  
CGAATCCCTTCCTCGCACACCTTGTTTAATCCAAGGCGAATGGCACTTTCCAGGCTA

TCCACATCCCAGGTGACATAGCCGTTCTGACTATGCAGCCCATTTGTTAAAACGATGG  
 ATTTTCGCGCAGCGTCAGGCTGCGGCATTCACGCTCGTAACGCGCCAGCATCACGCGC  
 CCACTGGATGCGCCGAGATCGACGGCGACACAATTGCGAAAGGTCATAATGTGATC  
 CTGCTGAATTTTCATTACGACCAGTCTAAAAAGCGCCTGAATTCGCGACSTTCTCGTT  
 ACTGACAGGAAAATGGGCCATTGGCAACCAGGGAAAGATGAACGTGATGATGTTCA  
 CAATTTGCTGAATTGTGGTGATGTGATGCTCACC.

Бактериальная клетка-хозяин, имеющая хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2, обозначается в настоящем описании как XdevK.

В одном варианте осуществления изобретения способ разработки клетки-хозяина XdevK включает стадии:

- a) конструирования плазмиды pRhaBFS, и
- b) конструирования мутанта RhaB со сдвигом рамки считывания.

Для конструирования плазмиды pRhaBFS два праймера для амплификации способом ПЦР частей оперона rhaBAD с хромосомы штамма E. coli BL21 (названия праймеров в скобках) предпочтительно представляют собой:

- (SBamH11680 - SEQ ID 19) 5' gtacgctaGGATCCTGTGGCAGCAACTGATTC 3'
- (BSal11681 - SEQ ID 20) 5' gtagatagGTCGACAGCGATCGTCATTGGGAT 3'.

Также предусматриваются следующие варианты осуществления:

1. Конструкция ДНК, пригодная для экспрессии рекомбинантного белка в бактериальной клетке-хозяине, где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- промотор rhaBAD,
- активатор транскрипции RhaR,
- активатор транскрипции RhaS,
- маркер резистентности к антибиотику,
- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику,
- терминатор rnhB T1,
- терминатор rnhB T2, и
- ориджин репликации pMB1.

2. Конструкция ДНК согласно варианту осуществления 1, где

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, предпочтительно маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор AmpR, предпочтительно промотор AmpR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью

последовательности с ней;

- терминатор *trnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор *trnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; и/или

- рМВ1 ориджин репликации содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

3. Конструкция ДНК согласно варианту осуществления 1 или 2, где

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор *AmpR*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;

- терминатор *trnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

- терминатор *trnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15;

и/или

- ориджин репликации рМВ1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

4. Конструкция ДНК согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где:

- промотор *rhaBAD* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 8;

- активатор транскрипции *RhaR* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 9 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 9;

- активатор транскрипции *RhaS* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 11;

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

- промотор *AmpR* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID

13;

- терминатор *trnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

- терминатор *trnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 15; и

- ориджин репликации *rMB1* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

5. Конструкция ДНК согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где конструкция ДНК содержит участок множественного клонирования, содержащий 17 участков рестрикции, расщепляемых ферментами рестрикции *EcoRI*, *NdeI*, *NotI*, *XhoI*, *PspXI*, *PaeR71*, *BbsI*, *StyI*, *AvrII*, *BanI*, *Acc65I*, *KpnI*, *Eco53kI*, *SacI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *AccI*, *PstI*, *SbfI*, *SphI* и *HindIII*.

6. Конструкция ДНК согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 1 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 1.

7. Конструкция ДНК согласно любому из вариантов осуществления 1-4, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный рекомбинантный белок, где нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный белок, функционально связана с промотором *ghaBAD*, где указанный рекомбинантный белок представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент; предпочтительно указанный рекомбинантный белок представляет собой ранибизумаб или его фрагмент; и более предпочтительно указанный рекомбинантный белок представляет собой ранибизумаб, содержащий (i) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 3, и/или (ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 4.

8. Конструкция ДНК согласно варианту осуществления 7, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный белок, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; предпочтительно указанная нуклеотидная

последовательность, кодирующая рекомбинантный белок, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6.

9. Конструкция ДНК согласно варианту осуществления 8, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая рекомбинантный белок, дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который функционально связан в направлении транскрипции с любой или обеими из нуклеотидных последовательностей SEQ ID 5 и SEQ ID 6, предпочтительно сигнальный пептид представляет собой PelB; более предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; наиболее предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7.

10. Конструкция ДНК согласно варианту осуществления 9, где указанная конструкция ДНК содержит последовательность SEQ ID 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно содержит последовательность SEQ ID 17.

11. Экспрессирующий вектор, содержащий конструкцию ДНК согласно любому из вариантов осуществления 1-10.

12. Бактериальная клетка-хозяин, содержащая конструкцию ДНК согласно любому из вариантов осуществления 1-10, или экспрессирующий вектор согласно варианту осуществления 11, где указанная бактериальная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку *Escherichia coli*, более предпочтительно клетку *E. coli* K-12.

13. Клетка-хозяин согласно варианту осуществления 12, где указанная клетка-хозяин содержит либо (i) хромосому, которая содержит мутацию в нуклеотидной последовательности гена *rhaB*, которая инактивирует *RhaB*, либо (ii) хромосому, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая *RhaB*, делетирована.

14. Клетка-хозяин согласно варианту осуществления 12 или 13, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, предпочтительно содержащую хромосому, которая содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей *RhaB*.

15. Клетка-хозяин согласно любому из вариантов осуществления 12-14, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, содержащую хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 2; где необязательно хромосома клетки-хозяина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую *RhaT*.

16. Способ продуцирования рекомбинантного белка, включающий стадию

воздействия на бактериальную клетку-хозяина согласно любому из вариантов осуществления 12-15 рамнозой, тем самым индуцируя экспрессию указанного рекомбинантного белка.

17. Способ согласно варианту осуществления 16, дополнительно включающий стадию выделения рекомбинантного белка из бактериальной клетки-хозяина; необязательно дополнительно включающий одну или несколько стадию(й) очистки выделенного рекомбинантного белка, предпочтительно посредством одной или нескольких стадий хроматографии.

Настоящее изобретение имеет множество аспектов, проиллюстрированных в примерах 1-8 неограничивающего раздела "Примеры" ниже. Следует понимать, что эти примеры, касающиеся применения клеток-хозяев XdevK и/или плазмиды KTXNIS, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации. Из описанных выше вариантов осуществления и приведенных ниже примеров специалист может установить ключевые характеристики настоящего изобретения и, без отклонения от его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации в изобретение для адаптации его к различным типам терапевтических антител и иммуноглобулинов. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение к модификациям, показанным и описанным в настоящем описании, будут очевидны специалистам в данной области из приведенного выше описания. Также подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Примером такой модификации является то, что одна или несколько из указанных выше SEQ ID 1-18 может быть заменена последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1 относится к конструированию клетки-хозяина XdevK.

Пример 2 относится к конструированию экспрессирующего вектора KTXNIS-PelbLC-PelbHC.

Пример 3 относится к легкой и тяжелой цепям ранибизумаба, экспрессируемым экспрессирующим вектором согласно примеру 2.

Пример 4 демонстрирует лучший титр ранибизумаба, продуцированного в соответствии с настоящим изобретением, по сравнению с титром ранибизумаба, продуцированного способом, описанным в документе уровня техники.

Пример 5 демонстрирует, что ранибизумаб, продуцированный в соответствии с настоящим изобретением, свободен от бактериофагов.

Пример 6 представляет собой сравнительный эксперимент, демонстрирующий лучшую титруемость в случае настоящего изобретения по сравнению с клетками-хозяевами и/или плазмидами уровня техники.

Пример 7 представляет собой сравнительный эксперимент, демонстрирующий лучшее качество, чистоту и титр в случае настоящего изобретения по сравнению с клетками-хозяевами и/или плазмидами уровня техники.

Пример 8 представляет собой сравнительный эксперимент, демонстрирующий улучшенный контроль экспрессии в случае настоящего изобретения по сравнению с клетками-хозяевами и/или плазмидами уровня техники.

#### Пример 1 - Разработка штамма

Клетка-хозяин XdevK является производным *E. coli* W3110 со сдвигом рамки считывания в хромосомной копии *RhaB*, что делает ее неспособной использовать рамнозу в качестве источника углерода. Клетка-хозяин XdevK была разработана в качестве штамма для индуцируемой рамнозой системы, где нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес рекомбинантный белок, клонирована в плазмиду KTXNIS и экспрессируется под контролем индуцируемого рамнозой промотора.

Начальным штаммом для клетки-хозяина XdevK был *E. coli* W3110, и сходный способ получения клетки-хозяина XdevK описан в Wilms et al. в разделе под названием "Construction of the Production Strain *E. coli* BW3110" [3].

Способ разработки клетки-хозяина XdevK включает стадии:

- c) конструирования плазмиды pRhaBFS и
- d) конструирования мутанта *RhaB* со сдвигом рамки считывания.

Стадия (a) - Конструирование плазмиды pRhaBFS:

Приведенные ниже два праймера использовались для амплификации способом ПЦР частей оперона *rhaBAD* из хромосомы штамма *E. coli* BL21 (названия праймеров в скобках):

- (SBamHI1680) 5' gtacgctaGGATCCTGTGGCAGCAACTGATTC 3'

- (BSalI1681) 5' gtagatagGTCGACAGCGATCGTCATTGGGAT 3'

Продукт ПЦР очищали и расщепляли BamHI и SalI и лигировали с плазмидой pLemo (такую как pLemo, описанная в US8138324), которая была расщеплена BamHI и SalI. Затем плазмиду pLemo со вставкой расщепляли ClaI. Продукт расщепления инкубировали с полимеразой T4 для создания тупых концов, а затем лигировали. Полученную плазмиду pLemo с встроенной геномной областью оперона *rhaBAD* с двумя дополнительными основаниями инкубировали с BamHI и SalI. Фрагмент, содержащий геномную область оперона *rhaBAD* с 2 дополнительными основаниями, очищали и лигировали с плазмидой pmak705, расщепленной BamHI и SalI. Плазмида, полученная посредством лигирования, была названа pRhaBFS, и последовательность была подтверждена секвенированием.

Стадия (b) - Конструирование мутанта *RhaB* со сдвигом рамки считывания.

Клетки *E. coli* W3110 трансформировали плазмидой pRhaBFS для замены гена, а затем высевали на агар LB Vegitone, содержащий хлорамфеникол (20 мкг/мл), и инкубировали при 30°C в течение 20 часов. Единичные колонии отбирали и помещали в LB vegitone и выращивали при 30°C до достижения OD<sub>600</sub> 0,5. 5 мкл переносили из культуры на чашку с агаром LB Vegitone, содержащим хлорамфеникол (20 мкг/мл), и инкубировали при 43°C в течение 16 часов. Колонии тестировали в отношении правильной вставки в хромосому с использованием ПЦР. Колонии с правильной вставкой

выращивали в LB Vegitone, содержащей хлорамфеникол (20 мкг/мл), до насыщения три раза, а затем выращивали в течение 20 часов в LB Vegitone. Затем один мкл высевали на планшет с LB Vegitone. Планшет с LB Vegitone использовали в качестве основы для посева реплик на чашку с агаром McConkey, дополненную 1% рамнозой, для подтверждения, что клетки не могут использовать рамнозу в качестве источника углерода. Одну колонию отбирали и выращивали в LB Vegitone (Sigma), а затем разделяли на аликвоты, и она была названа экспрессирующим штаммом XdevK. Хромосомную копию гена rhaB из XdevK амплифицировали посредством ПЦР. Продукт ПЦР секвенировали и подтверждали правильное встраивание двух оснований (CG) (см. подчеркнутые основания CG в SEQ ID 2):

GTTGGCCCCGCTCCACGCCAGTAGCGACTCGTCCCAGTCGTCGCTATTGATAT  
 TGACCAGTTGCGTGGTCGTGGCGTTGGTATATTCCCAGTTCATCTTGCCGGTCAGGC  
 GATAACTGAAGTAATCCGGCATCAGCAGAGCGTGAGCAATGTGTGGAATAAGTTCA  
 GGTTGTTGCTCCGTCAGCGCACGCAACTGATAAAGCGTATTGAAGGGCAGAACTG  
 GATGCCGCTACGTTGATAAATATCGCGTTTGCCGAGTTGTTGTTGTGCCTGCGCCATT  
 AGGCCATTGGTGCGGCTATCGCGATAAGCAACGGGCAGGCCACACGCTGACCCTG  
 TTGGTCGAGCAGCACAAAGTCCACGCCCCAGGTATCAATCCCAATGCTATCGCGATA  
 CGAATCCCTTCCTCGCACACCTTGTTTAATCCAAGGCGAATGGCACTTTCAGGCTA  
 TCCACATCCCAGGTGACATAGCCGTTCTGACTATGCAGCCATTGTTAAAACGATGG  
 ATTTGCGCGCAGCGTCAGGCTGCGGCATTCACGCTCGTAACGCGCCAGCATCACGCGC  
 CCACTGGATGCGCCGAGATCGACGGCGACACAATTGCGAAAGGTCATAATGTGATC  
 CTGCTGAATTTCAATTACGACCAGTCTAAAAAGCGCCTGAATTCGCGACSTTCTCGTT  
 ACTGACAGGAAAATGGGCCATTGGCAACCAGGGAAAGATGAACGTGATGATGTTCA  
 CAATTTGCTGAATTGTGGTGATGTGATGCTCACC

#### Пример 2 - KTXHIS-PelbLC-PelbHC

Сигнальный пептид PelB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 7, подвергали слиянию перед нуклеиновыми кислотами, кодирующими как легкую цепь, так и тяжелую цепь, ранибизумаба, а затем клонировали в экспрессирующую плазмиду KTXHIS. Полученная нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 17 и обозначается как KTXHIS-PelbLC-PelbHC в настоящем описании. Более того, карта плазмиды KTXHIS-PelbLC-PelbHC проиллюстрирована на фиг.3.

Нуклеотидная последовательность SEQ ID 17 описана ниже и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь, слитую с сигнальной последовательностью PelB, подчеркнута, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь, слитую с сигнальной последовательностью PelB, выделена полужирным шрифтом (также см. фиг.3 для организации PelB в отношении легкой и тяжелой цепей ранибизумаба):

ATCTTTCTGCGAATTGAGATGACGCCACTGGCTGGGCGTCATCCCGGTTTCCC  
 GGGTAAACACCACCGAAAAATAGTTACTATCTTCAAAGCCACATTCGGTCGAAATA



TCACTGATTAACAGGCGGCTATGCTGGAGAAGATATTGCGCATGACACACTCTGACC  
 TGTCGCAGATATTGATTGATGGTCATTCCAGTCTGCTGGCGAAATTGCTGACGCAA  
 ACGCGCTCACTGCACGATGCCTCATCACAAAATTTATCCAGCGCAAAGGGACTTTTC  
 AGGCTAGCCGCCAGCCGGGTAATCAGCTTATCCAGCAACGTTTCGCTGGATGTTGGC  
 GGCAACGAATCACTGGTGTAAACGATGGCGATTTCAGCAACATCACCAACTGCCCGAA  
 CAGCAACTCAGCCATTTTCGTTAGCAAACGGCACATGCTGACTACTTTTCATGCTCAAG  
 CTGACCAATAACCTGCCGCGCCTGCGCCATCCCCATGCTACCTAAGCGCCAGTGTGG  
 TTGCCCTGCGCTGGCGTTAAATCCCGGAATCGCCCCCTGCCAGTCAAGATTCAGCTT  
 CAGACGCTCCGGGCAATAAATAATATTCTGCAAACCAGATCGTTAACGGAAGCGT  
 AGGAGTGTTTATCATCAGCATGAATGTAAAAGAGATCGCCACGGGTAATGCGATAA  
 GGGCGATCGTTGAGTACATGCAGGCCATTACCGCGCCAGACAATCACCAGCTCACA  
 AAAATCATGTGTATGTTTCAGCAAAGACATCTTGCGGATAACGGTCAGCCACAGCGA  
 CTGCCTGCTGGTCGCTGGCAAAAAAATCATCTTTGAGAAGTTTTAACTGATGCGCCA  
 CCGTGGCTACCTCGGCCAGAGAACGAAGTTGATTATTCGCAATATGGCGTACAAAT  
 ACGTTGAGAAGATTCGCGTTATTGCAGAAAGCCATCCCGTCCCTGGCGAATATCACG  
 CGGTGACCAGTTAAACTCTCGGCGAAAAAGCGTCGAAAAGTGGTTACTGTGCTGA  
 ATCCACAGCGATAGGCGATGTCAGTAACGCTGGCCTCGCTGTGGCGTAGCAGATGT  
 CGGGCTTTCATCAGTCGCAGGCGGTTTCAGGTATCGCTGAGGCGTCAGTCCCGTTTGC  
 TGCTTAAGCTGCCGATGTAGCGTACGCAGTGAAAGAGAAAATTGATCCGCCACGGC  
 ATCCCAATTCACCTCATCGGCAAAATGGTCCTCCAGCCAGGCCAGAAGCAAGTTGA  
 GACGTGATGCGCTGTTTTCCAGGTTCTCCTGCAAACCTGCTTTTACGCAGCAAGAGCA  
 GTAATTGCATAAACAAGATCTCGCGACTGGCGGTGAGGGTAAATCATTTTCCCCTT  
 CCTGCTGTTCCATCTGTGCAACCAGCTGTGCGCACCTGCTGCAATACGCTGTGGTTAA  
 CGCGCCAGTGAGACGGATACTGCCATCCAGCTCTTGTGGCAGCAACTGATTCAGCC  
 CGGCGAGAAACTGAAATCGATCCGGCGAGCGATACAGCACATTGGTCAGACACAGA  
 TTATCGGTATGTTTCATACAGATGCCGATCATGATCGCGTACGAAACAGACCGTGCCA  
 CCGGTGATGGTATAGGGCTGCCATTAAACACATGAATACCCGTGCCATGTTTCGACA  
 ATCACAATTTTCATGAAAATCATGATGATGTTTCAGGAAAATCCGCCTGCGGGAGCCG  
 GGGTTCTATCGCCACGGACGCGTTACCAGACGGAAAAAAATCCACACTATGTAATA  
 CGGTCATACTGGCCTCCTGATGTGTCGTAACACGGCGAAATAGTAATCACGAGGTCA  
 GGTTCTTACCTTAAATTTTCGACGGAAAACCACGTAAAAAACGTCGATTTTTCAAGA  
 TACAGCGTGAATTTTCAGGAAATGCGGTGAGCATCACATCACCACAATTCAGCAAA  
 TTGTGAACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAATGGCCCATTTTCTTGTGAG  
 TAACGAGAAGGTCGCGAATCCAGGCGCTTTTTAGACTGGTCGTAATGAAATTCAGG  
 AGGAATTCCTAATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGG  
CAGCACAGCCTGCAATGGCAGATATTCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGC  
GCAAGCGTTGGTGATCGTGTTACCATTACCTGTAGCGCAAGCCAGGATATTAGCAAT  
TATCTGAATTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCACCGAAAGTGCTGATCTATTTT  
ACCAGCAGCCTGCATAGCGGTGTTCCGAGCCGTTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACC  
GATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCAACCTATTATTGT

CAGCAGTATAGCACCGTTCCGTGGACCTTTGGTCAGGGCACCAAAGTTGAAATTA  
ACGTACCGTTGCAGCACCGAGCGTTTTTATCTTTCCGCCTAGTGATGAACAGCTGAA  
AAGCGGCACCGCAAGCGTTGTTTGTCTGCTGAATAACTTTTATCCGCGTGAAGCAA  
AGTTCAGTGGAAAGTTGATAATGCACTGCAGAGCGGTAATAGCCAAGAAAGCGTTA  
CCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC  
AAAGCAGATTATGAAAAACACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCT  
GAGCAGTCCGTTACCAAAGTTTTAATCGTGGTGAATGCTAATAATCTAGAACTGT  
TATCGATATCAGGAGGATTAGCATATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCG  
GGTCTGCTGCTGCTGGCAGCACAGCCTGCAATGGCAGAAGTTCAGCTGGTTGA  
AAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCAG  
CAAGCGGTTATGATTTTACCCATTATGGTATGAATTGGGTTTCGTCAGGCACCGG  
GTAAGGTCTGGAATGGGTTGGTTGGATTAATACCTATAACCGGTGAACCGACC  
TATGCAGCAGATTTTAAACGTCGTTTTACCTTTAGCCTGGATAACAGCAAAAGC  
ACCGCATATCTGCAGATGAATAGCCTGCGTGCAGAGGATAACCGCAGTGTATTA  
TTGTGCAAAATATCCGTATTATTACGGCACCCAGCCATTGGTATTTTCGATGTTTG  
GGGTCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCAGCGCAAGCACCAAAGGTCCGAGCG  
TTTTTCCGCTGGCACCGAGCAGCAAAAGTACCAGCGGTGGCACCGCAGCACTG  
GGTTGTCTGGTTAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTACCGTGAGCTGGAATAGC  
GGTGCCTGACCAGCGGTGTTACATACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCGG  
TCTGTATAGCCTGAGCAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCAGCAGCCTGGGCACCC  
AGACCTATATTTGTAATGTTAATCATAAACCGAGCAATACCAAAGTGGATAAAA  
AAGTGGAAACCGAAAAGCTGCGATAAAAACCCATCTGTAATAAAAGCTTGGCTGTTT  
TGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGAAGCG  
GTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCC  
ATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCA  
TGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGA  
CTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAT  
CCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAG  
GACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGAT  
GGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGT  
ATCCGCTCATGAGACTAGGCTTCCGCGCCCTCATCCGAAAGGGCGTATTCATATATG  
CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTC  
CGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC  
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA  
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT  
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTC  
AAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTG  
GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC  
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT  
TCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCC

GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC  
 TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG  
 CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAG  
 TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCT  
 CTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC  
 AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT  
 CTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAA  
 AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAA  
 GTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGA  
 AACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCT  
 GTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTAT  
 CGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCA  
 AAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAA  
 TGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTC  
 GTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGC  
 GAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA  
 ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATT  
 CTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCAT  
 CATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGC  
 CAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTT  
 TCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTTCGCACCTG  
 ATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATAACCATATAAATCAGCATCCATGTTGG  
 AATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCC  
 TTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATT  
 TGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG  
 TGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGC  
 GTATCACGAGGCCCTTTCGTCT

Пример 3 - Рекомбинантный белок - ранибизумаб

Аминокислотная последовательность легкой цепи ранибизумаба,  
 экспрессированной экспрессирующим вектором KTXHIS-PelbLC-PelbHC, содержит  
 последовательность SEQ ID 3:  
 DIQLTQSPSSLASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR  
 FSGSGSGLDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL  
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба,  
 экспрессированной экспрессирующим вектором KTXHIS-PelbLC-PelbHC, содержит  
 последовательность SEQ ID 4:  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTG  
 PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWG

QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL.

Более того, полученный сигнальный пептид PelB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID 18 [6]: MKYLLPTAAAGLLLLAAQRAMA.

Пример 4 - Лучший титр ранибизумаба, продуцированного в соответствии с настоящим изобретением, по сравнению с титром уровня техники

Было получено 3 разных партии, содержащих ранибизумаб, в соответствии с описанным ниже способом.

Приготавливали минимальную среду, и ее инокулировали посредством культивирования в течение ночи клеток-хозяев XdevK, содержащих экспрессирующий вектор KTXHIS-PelbLC-PelbHC, из вращающейся колбы. Температура ферментации составляла 30°C, и культуры выращивали в течение 22 ч в фазе подпитки. После этой фазы следовала фаза роста в течение 10 ч. Температуру доводили до 28,5°C, а затем скорость роста снижали посредством контроля подачи глюкозы. Культуру индуцировали 500 мкМ рамнозы, инжестрированной в ферментер. Глюкозную подпитку также дополняли рамнозой для непрерывной индукции на протяжении фазы индукции. Материал собирали после индукции в течение 36 ч. Общее время ферментации составило 68 ч и собранный объем составил 8530 мл.

После сбора весь материал, среды и клетки, гомогенизировали. 5500 мл хранили при -80°C и 3000 мл очищали и промывали с использованием TFF. Клетки промывали три раза объемом, равным первоначальному объему, для увеличения высвобождения продукта. Полученный продукт, содержащий ранибизумаб, очищали с использованием аффинной хроматографии capto L, которая также является способом хроматографии, использованным в Kumar et al. [4] (см. разделы 2.4 и 3.2 в Kumar et al.), а затем определяли концентрацию очищенного ранибизумаба.

Первая, вторая и третья партии имели титр ранибизумаба 531 мг/л, 487 мг/л и 518 мг/л, соответственно.

Для сравнения, в документе уровня техники Kumar et al (в котором описаны сходные способы очистки), титр ранибизумаба находился в диапазоне от 5 мг/л до 25 мг/л, как указано на фиг. 6 и в реферате указанного документа [4].

Следовательно, способ в соответствии с настоящим изобретением (а также применение клетки-хозяина XdevK и экспрессирующего вектора KTXHIS-PelbLC-PelbHC в нем) обеспечивает неожиданно более высокие уровни титра ранибизумаба по сравнению со способами уровня техники.

Пример 5 - Хранение клеток

XdevK трансформировали KTXHIS-PelbLC-PelbHC. Единичную колонию отбирали и выращивали в среде для биореактора с определенным химическим составом (DBM) в течение ночи, на следующий день добавляли 20% глицерин, культуру распределяли на аликвоты и хранили при -80°C. Одну аликвоту (50 мкл) использовали для инокуляции 100 мл среды для биореактора с определенным химическим составом (DBM) и

культивировали в течение 24 ч при 30°C, температуру переключали на 35°C и клетки культивировали в течение дополнительных 6 ч для повышения OD. OD A600 нм=4,44. Добавляли 20% глицерина, культуру распределяли на аликвоты (аликвоты объемом 100 мкл) и замораживали при -80°C в качестве RCB100.

Аликвоты штамма отправляли для тестирования фага и тестирования чистоты микроорганизмов в Charles River Laboratories. В отчете было указано: "было сделано заключение, что RCB100 свободен от бактериофага при тестировании в отношении как лизогенного профага, так и свободного бактериофага. Предел количества свободного бактериофага составляет менее 1 бляшкообразующей единицы на мл ночной культуры".

Пример 6 - Сравнительные эксперименты, демонстрирующие лучшую титруемость

#### *Материалы и способы*

Следующие три штамма использовали в сравнительных экспериментах:

1. Клетка-хозяин XdevK, описанная в приведенном выше примере 1; иными словами, она представляет собой штамм, который:

- имеет фон штамма W3110, имеющий генотип: F-,  $\lambda$ -, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1);
- представляет собой производное K-штамма и содержит мутацию в гене RhaB, что делает ее неспособной деградировать рамнозу и использовать рамнозу в качестве источника углерода.

2. XB210, описанный в Hjelm et al. [2], который:

- представляет собой штамм BL21 (DE3), имеющий генотип: F- dompt hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3));
- представляет собой производное B-штамма и содержит мутацию в гене RhaB и делецию гена переносчика рамнозы (RhaT), что делает его неспособным активно транспортировать, деградировать рамнозу и использовать рамнозу в качестве источника углерода;
- содержит части профага DE3, встроенные в хромосому, и не экспрессирует протеазу lon или протеазу OmpT; и

3. MG1655, описанный в Giacalone et al. [5], который представляет собой K-штамм дикого типа E. coli.

Следующие четыре экспрессирующие плазмиды использовали для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты для ранибизумаба, т.е. последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи ранибизумаба, клонировали в следующие экспрессирующие плазмиды:

1. KTXHIS;
2. pRha109A, описанная в Giacalone et al. [5];
3. pRha67A, описанная в Giacalone et al. [5]; и
4. pRha67K, описанная в Hjelm et al. [2].

Полученные экспрессирующие векторы подтверждали посредством полного секвенирования.

Более того, полученные экспрессирующие векторы вводили в штаммы XdevK,

XB201 и MG1655 (т.е. клетки-хозяева) для тестирования различных комбинаций штаммов и плазмид для понимания влияния на титруемость, титр, качество и контроль экспрессии.

*Схема эксперимента для сравнений титруемости*

Экспрессирующие векторы, содержавшие тяжелую и легкую цепи ранибизумаба, трансформировали в XdevK, XB201 и MG1655 с использованием стандартных протоколов. Ночные культуры получали путем инокуляции единичной колонии в 3 мл жидкой среды LB-veg, содержащей 100 мкг/мл ампициллина или 50 мкг/мл канамицина в зависимости от конструкции. Культуры инкубировали в 15-мл пробирке falcon при 37°C при встряхивании в течение 16 часов. Затем культуры подвергали обратному разведению (1:50) в 5 мл LB-veg с антибиотиками в 24-ячеечной планшете для выращивания и инкубировали, как описано выше, до достижения OD600 приблизительно 0,3-0,5. Экспрессию индуцировали добавлением 5, 50, 100, 250, 500, 5000 мкМ рамнозы, а затем проводили инкубацию в течение 5 часов при 30°C при встряхивании. Объем клеток, соответствовавший OD600 0,2 единицы, собирали, ресуспендировали в 20 мкл 2× буфера для загрузки Laemlli, кипятили в течение 5 мин, после чего 7,5 мкл анализировали посредством 12% mini SDS-PAGE. Затем гель сразу переносили на нитроцеллюлозную/PVDF мембрану и обрабатывали антителом против Fab для анализа с использованием вестерн-блоттинга.

*Результаты и обсуждение - титруемость*

На фиг.4а, 4б, 4с и 4d показаны вестерн-блоты для сравнений титруемости. Каждая контрольная дорожка загружена очищенным ранибизумабом.

На фиг.4а представлено:

- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC; и
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67K (67K).

На фиг.4б представлено:

- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XB201 в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67K (67K); и
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67A (67A).

На фиг.4с представлено:

- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha109A (109A); и
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме MG1655 в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67A (67A).

На фиг.4d представлено:

- повторение эксперимента, демонстрирующего накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC для визуализации титруемости при комбинированном применении конфигурации XdevK и KTXHIS-PelbLC-

PelbHC.

На фиг.4а, 4b, 4с и 4d отчетливо и недвусмысленно показано, что конфигурация с XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC имеет лучший технический эффект относительно других конфигураций при сравнении титруемости, поскольку:

- экспрессия ранибизумаба возрастает постепенно при каждом добавлении к XdevK/KTXHIS-PelbLC-PelbHC 5, 50, 100, 250, 500, 5000 мкМ рамнозы; и
- экспрессия ранибизумаба не возрастает постепенно в любых других комбинациях - см., например, комбинацию XB201/67K, которая приводит к "плечу", т.е. постепенному повышению, но затем постепенному снижению.

Более того, на фиг.4а, 4b, 4с также показано, что клетки, содержавшие экспрессирующие векторы на основе плазмид pRha109A или pRha67A, накапливали очень мало ранибизумаба, по меньшей мере в 100 раз меньше, чем другие конфигурации с использованием либо KTXHIS-PelbLC-PelbHC, либо экспрессирующего вектора на основе плазмиды pRha67K (где указанную кратность изменения наблюдали при сравнении с количеством загруженного положительного контроля).

Следует отметить, что комбинации:

- MG1655 и экспрессирующих векторов на основе плазмиды pRha109A (см. фиг.6),
- MG1655 и экспрессирующих векторов на основе плазмиды pRha67K (см. фиг.7b),
- MG1655 и KTXHIS-PelbLC-PelbHC (см. фиг.7b),

не обеспечили поддающуюся детекции продукцию ранибизумаба и, таким образом, эксперименты по определению титруемости для указанных комбинаций не проводились.

Таким образом, в заключение, XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC обеспечивает лучшую титруемость по сравнению с конфигурациями, известными из уровня техники. Таким образом, это позволяет точную настройку скорости продуцирования рекомбинантных белков и, таким образом, скорости продуцирования рекомбинантных белков могут быть установлены точно и стабильно.

Пример 7 - Сравнительные эксперименты, демонстрирующие лучшее качество и титр

*Экспериментальная конфигурация для экспериментов для определения титра и качества*

Экспрессирующие векторы, содержавшие тяжелую и легкую цепи ранибизумаба, трансформировали в XdevK, XB201 и MG1655 с использованием стандартных протоколов для получения Клеточного банка для исследований (RCB) из соответствующей комбинации штамма и плазмиды. Прекультуру (во вращающейся колбе) инокулировали из одного флакона с RCB и выращивали в течение ночи (O/N) в среде для реактора с определенным химическим составом: дигидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 4,5 г/л, гидрофосфат калия ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 3,0 г/л, сульфат аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 3,75 г/л, дигидрат трицитрата натрия ( $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 1,88 г/л, гексагидрат хлорида железа (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,0525 г/л, гептагидрат сульфата цинка ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,0158 г/л, пентагидрат сульфата меди(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,00397 г/л, моногидрат сульфата марганца

( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0,0198 г/л, дигидрат хлорида кальция ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,0207 г/л, и 17,1 мл 60% (об./масс.) стерильного раствора глюкозы, 2,432 мл 2,5 М  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 мл раствора канамицина 50 мг/мл. pH корректировали добавлением 1,5 мл 25% раствора гидроксида аммония (до приблизительно 6,95). Подготавливали ящичный ферментер DAS со средой для реактора с определенным химическим составом, и инокулировали в него прекультуру O/N. Рост клеток контролировали путем подпитки культуры со 60% (об./масс.) стерильной глюкозой. Фазу продуцирования начинали добавлением рамнозы в качестве индуктора. При необходимости профиль подпитки корректировали и к культуре добавляли соли. Клетки собирали после индукции в течение 20-42 ч, а затем проводили порционную очистку. Собранные образцы добавляли в 96-луночный микропланшет для титрования с глубокими лунками, который содержал лунки с предварительно замороженной водой, чтобы гарантировать охлаждение образца. Пустые лунки заполняли водой MilliQ (MQ). Обработку ультразвуком проводили с использованием зонда из 24-элементов на устройстве Sonics Vibra-cell в течение 3 циклов из 20 с, каждый с амплитудой 40% с паузой 30 с между циклами. Обработанные ультразвуком образцы переносили в 2-мл центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 20 мин при  $20000 \times g$  при  $4^\circ\text{C}$  в центрифуге 5430 R. Супернатант осторожно удаляли пипетированием и добавляли к 50% взвеси предварительно уравновешенной аффинной смолы Capto L. Уравновешивание проводили три раза посредством 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,2 (EQ). 1,9 мл супернатанта использовали для загрузки 100 мкл взвеси Capto L, что соответствует уровню загрузки 9,5 мл/мл смолы. Супернатант и смолу инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре (к.т.) при встряхивании при 1500 об/мин на ThermoMixer C с последующим центрифугированием в течение 1 мин при  $2000 \times g$  при к.т. Супернатанты удаляли. Смолу промывали два раза добавлением 500 мкл EQ и отделения смолы центрифугированием при  $2000 \times g$ , как описано выше. В ходе третьей стадии промывания с использованием 300 мкл EQ, смолу переносили на центрифужные чашки с фильтром из ацетата целлюлозы, подходящие для 400 мкл, и центрифугировали, как описано выше. Четвертую стадию промывали с использованием 150 мкл EQ. Центрифужные чашки переносили в новые пробирки для сбора и проводили элюирование посредством 50 мМ ацетата натрия, pH 3,0, за три цикла с использованием всего 0,4 мкл на мкл смолы (например,  $3 \times 40$  мкл для использованных 50 мкл взвеси). Концентрацию белка в элюатах анализировали с использованием аффинной ВЭЖХ. Качество образцов анализировали посредством SDS-PAGE и SCX-ВЭЖХ.

#### *Результаты и обсуждения для экспериментов по определению титра и качества*

Образцы анализировали с использованием SDS-PAGE, как проиллюстрировано на фиг.5. Нельзя было выявить поддающихся детекции отличий качества, паттерна увеличения количества полос или увеличенных количеств свободной легкой цепи или тяжелой цепи. Однако, конфигурация с использованием штамма XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67A дала очень малое количество материала, и полосы нельзя было обнаружить. Более того, конфигурация с



использованием штамма XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha109A росла очень плохо и, таким образом, была собрана после более короткого времени индукции (20 часов, в то время как все другие образцы собирали после 42 часов).

Количество продуцированного материала оценивали с использованием аффинной ВЭЖХ, и оно обобщенно представлено на фиг.6, где отчетливо показано, что конфигурация, которая обеспечивала наиболее высокий выход, представляла собой штамм XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC.

Качество материала, полученного посредством порционной очистки, оценивали посредством SCX-ВЭЖХ, и оно обобщенно представлено в таблице 1. Проанализированный материал конфигурации штамма XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67A не был надежным, поскольку эта конфигурация продуцировала слишком мало материала, так что его трудно было анализировать. Материал конфигурации штамма XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha109A был собран после более короткого времени индукции, поскольку клетки росли очень медленно по сравнению с другими клетками. Данные SCX-ВЭЖХ, обобщенно представленные в таблице 1, отчетливо демонстрируют, что материал, продуцированный в и очищенный из штамма XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC, является лучшим с точки зрения чистоты (т.е. качества) по сравнению с другими конфигурациями.

Таблица 1. Обобщение данных SCX ВЭЖХ о чистоте.

<b>Описание</b>	<b>MG1655/67A</b>	<b>XdevK /109A</b>	<b>XdevK /67A</b>	<b>XdevK /67K</b>	<b>XdevK/КТ XHIS- PelbLC- PelbHC</b>	<b>XB201/67A</b>
Чистота ранибизумаба в %	30,6	53,0	59,3	73,8	83,0	71,5

Таким образом, в заключение, штамм XdevK в комбинации с KTXHIS-PelbLC-PelbHC является лучшим по сравнению с другими конфигурациями как в отношении качества продуцированного ранибизумаба, так и в отношении выхода продуцированного ранибизумаба.

Пример 8 - Сравнительные эксперименты, демонстрирующие лучший контроль экспрессии

*Схема эксперимента для оценки контроля экспрессии*

Экспрессирующие векторы, содержавшие тяжелую и легкую цепи ранибизумаба, трансформировали в XdevK и MG1655 с использованием стандартных протоколов. Ночные культуры получали посредством инокуляции единичной колонии в 3 мл жидкой среды LB-veg, содержавшей 100 мкг/мл ампициллина или 50 мкг/мл канамицина в

зависимости от используемой плазмиды. Культуры инкубировали в 15-мл пробирке Falcon при 37°C при встряхивании в течение 16 часов. Затем культуры подвергали обратному разведению (1:50) в 5 мл LB-veg с антибиотиками в 24-ячеечной планшете для выращивания и инкубировали, как описано выше, до достижения OD600 приблизительно 0,3-0,5, и анализировали разные условия экспрессии. Одну группу культур выращивали в присутствии 0,2% глюкозы. Экспрессию индуцировали добавлением 250 мкМ рамнозы в подгруппе культур и проводили инкубацию при 30°C при встряхивании. Объем клеток, соответствовавший OD600 0,2 единицы, собирали (центрифугировали) после 24 часов, ресуспендировали в 20 мкл 2× буфера для загрузки Laemlli, кипятили в течение 5 мин и анализировали (7,5 мкл) посредством 12% mini SDS-PAGE. Затем гель сразу переносили на нитроцеллюлозную/PVDF мембрану и обрабатывали антителом против Fab.

#### *Результаты и обсуждение контроля экспрессии*

На фиг.7а, 7b и 7с представлены вестерн-блоты для сравнения контроля экспрессии. Каждая из контрольных дорожек загружена ранибизумабом. Образцы в дорожке 1 для каждой конфигурации выращивали в присутствии 0,2% глюкозы и индуцировали 250 мкМ рамнозой. Образцы в дорожке 2 для каждой конфигурации выращивали в присутствии 0,2% глюкозы. Образцы в дорожке 3 для каждой конфигурации индуцировали 250-мкМ рамнозой. Образцы в дорожке 4 для каждой конфигурации выращивали без каких-либо добавлений.

На фиг.7а представлено:

- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с KTXNIS-PelbLC-PelbHC; и
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67K (67K); и
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67A (67A).

На фиг.7b представлено:

- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha109A (109A);
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме MG1655 в комбинации с KTXNIS-PelbLC-PelbHC;
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме MG1655 в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67K (67K).

На фиг.7с представлено:

- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме MG1655 в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha67A (67A); и
- накопление экспрессированного ранибизумаба в штамме MG1655 в комбинации с экспрессирующим вектором на основе плазмиды pRha109A (109A).

При сравнении накопления ранибизумаба между разными конфигурациями на фиг.7а-7с, очевидно, что наиболее высокая экспрессия ранибизумаба, индуцированная

добавлением 250 мкМ рамнозы, как указано на дорожках 3, была обнаружено в штамме XdevK в комбинации с KTXNIS-PelbLC-PelbHC.

Интересно, что, как указано на дорожках 3 на фиг.7b и 7c, ни одна из конфигураций, вовлекающих штамм MG1655, не приводила к видимой экспрессии ранибизумаба.

Более того, среди конфигураций, которые приводили к экспрессии ранибизумаба на дорожках 3 (т.е. конфигурации, в которых использовался штамм XdevK), штамм XdevK в комбинации с KTXNIS-PelbLC-PelbHC приводил к наиболее низкой экспрессии ранибизумаба при выращивании в присутствии 0,2% глюкозы, как указано на дорожках 2. Это указывает на то, что штамм XdevK в комбинации с KTXNIS-PelbLC-PelbHC является менее склонным к растекающейся экспрессии в отсутствие индуцирующего агента. Растекающаяся экспрессия может иметь негативный эффект на рост клеток, вызывая снижение общего выхода. Растекающаяся экспрессия также может влиять на качество продуцированного материала, обеспечивая смесь разных типов накопленного экспрессированного белка, с которыми может быть проблематичным манипулирование в дальнейшей стадии очистки и, таким образом, это может приводить к более низкому выходу и усложнять процесс очистки.

Таким образом, контроль экспрессии ранибизумаба в штамме XdevK в комбинации с KTXNIS-PelbLC-PelbHC является лучшим по сравнению с другими конфигурациями.

В заключение, экспериментальные результаты, представленные в примерах 4, 6, 7 и 8, демонстрируют, что настоящее изобретение относится к следующим преимущественным и неожиданным эффектам по сравнению с экспрессирующими векторами и/или клетками-хозяевами уровня техники и, таким образом, являются пригодными, в частности, для промышленного продуцирования рекомбинантных белков:

- лучшая титруемость (пример 6);
- лучшая чистота и качество (пример 7);
- более высокий титр (примеры 4, 7 и 8); и
- лучший контроль экспрессии (пример 8).

#### ССЫЛКИ

1. Holcroft CC et al. Interdependence of activation at rhaSR by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and rhaR. *J Bacteriol.* 2000;182(23): 6774-6782
2. Hjelm, A. et al. Tailoring Escherichia coli for the l-Rhamnose PBAD Promoter-Based Production of Membrane and Secretory Proteins. *ACS synthetic biology* 2017; 6 6: 985-994.
3. Wilms, B. et al. High- cell- density fermentation for production of L- N-carbamoylase using an expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 73: 95-103
4. Kumar, D. et al. QbD Based Media Development for the Production of Fab Fragments in E. coli. *Bioengineering* 2019; 6, 29.
5. Giacalone MJ et al. "Toxic protein expression in Escherichia coli using a rhamnose-

based tightly regulated and tunable promoter system. *Biotechniques*. 2006; 40(3): 355-364.

6. Choi, J.H. et al. Secretary and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64, 625-635.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция ДНК для экспрессии ранибизумаба в бактериальной клетке-хозяине, где ранибизумаб содержит (i) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 3, и (ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 4,

где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ранибизумаб, где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая функционально связана в направлении транскрипции с нуклеотидной последовательностью, кодирующей легкую цепь ранибизумаба и/или тяжелую цепь ранибизумаба,

где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- промотор rhaBAD,
- активатор транскрипции RhaR,
- активатор транскрипции RhaS,
- маркер резистентности к антибиотику,
- по меньшей мере один терминатор, и
- а. ориджин репликации rMB1.

2. Конструкция ДНК по п.1, где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику.

3. Конструкция ДНК по п.1 или 2, где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие терминатор rtmB T1 и терминатор rtmB T2.

4. Конструкция ДНК по п.3, где

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, предпочтительно маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор AmpR, предпочтительно промотор AmpR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор rtmB T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор rtmB T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или

последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; и/или

- ориджин репликации рМВ1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

5. Конструкция ДНК по п.3 или 4, где

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор AmpR содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;

- терминатор *rrnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

- терминатор *rrnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15;

и/или

- ориджин репликации рМВ1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

6. Конструкция ДНК по п.3 или 4, где:

а. промотор *ghaBAD* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 8;

б. активатор транскрипции *RhaR* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 9 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 9;

с. активатор транскрипции *RhaS* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 11;

д. маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

е. промотор AmpR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;

ф. терминатор *rrnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

g. терминатор *rrnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 15; и

h. ориджин репликации *rMB1* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

7. Конструкция ДНК по любому из пп.1-6, где нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, функционально связана с промотором *ghaBAD*.

8. Конструкция ДНК по любому из пп.1-7, где нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

9. Конструкция ДНК по любому из пп.1-8, где нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6.

10. Конструкция ДНК по п.9, где нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, функционально связана в направлении транскрипции с любой одной или обеими из нуклеотидных последовательностей SEQ ID 5 и SEQ ID 6.

11. Конструкция ДНК по любому из пп.1-10, где сигнальный пептид представляет собой PelB.

12. Конструкция ДНК по п.11, где нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7.

13. Конструкция ДНК по п.11 или 12, где указанная конструкция ДНК содержит последовательность SEQ ID 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно содержит последовательность SEQ ID 17.

14. Экспрессирующий вектор, содержащий конструкцию ДНК по любому из пп.1-13.

15. Бактериальная клетка-хозяин, содержащая конструкцию ДНК по любому из

пп.1-13 или экспрессирующий вектор по п.14, где указанная бактериальная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку *Escherichia coli*, более предпочтительно клетку *E. coli* K-12.

16. Клетка-хозяин по п.15, где указанная клетка-хозяин содержит либо (i) хромосому, которая содержит мутацию в нуклеотидной последовательности гена *rhaB*, которая инактивирует *RhaB*, либо (ii) хромосому, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая *RhaB*, делетирована.

17. Клетка-хозяин по п.15 или 16, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, предпочтительно содержащую хромосому, которая содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей *RhaB*.

18. Клетка-хозяин по любому из пп.15-17, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, содержащую хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 2; где необязательно хромосома клетки-хозяина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую *RhaT*.

19. Способ продуцирования ранибизумаба, включающий стадию воздействия на бактериальную клетку по любому из пп.15-18 рамнозой, тем самым индуцируя экспрессию ранибизумаба.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий стадию выделения ранибизумаба из бактериальной клетки-хозяина; необязательно дополнительно включающий одну или несколько стадию(й) очистки выделенного ранибизумаба, предпочтительно посредством одной или нескольких стадий хроматографии.



**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,  
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Конструкция ДНК для экспрессии ранибизумаба в бактериальной клетке-хозяине, где ранибизумаб содержит (i) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 3, и (ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 4,

где указанная конструкция ДНК содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ранибизумаб, где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, которая функционально связана в направлении транскрипции с нуклеотидной последовательностью, кодирующей легкую цепь ранибизумаба и/или тяжелую цепь ранибизумаба,

где указанная конструкция ДНК дополнительно содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- промотор *rhaBAD*,
- активатор транскрипции RhaR,
- активатор транскрипции RhaS,
- маркер резистентности к антибиотику,
- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику,
- терминатор *gtnB T1*
- терминатор *gtnB T2*, и
- ориджин репликации *pMB1*.

2. Конструкция ДНК по п. 1, где

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, предпочтительно маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор *AmpR*, предпочтительно промотор *AmpR*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор *gtnB T1* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней;

- терминатор *gtnB T2* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней; и/или

- ориджин репликации *pMB1* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID

16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

3. Конструкция ДНК по п.1 или 2, где

- маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

- промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей маркер резистентности к антибиотику, представляет собой промотор AmpR содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;

- терминатор *rrnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

- терминатор *rrnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15; и/или

- ориджин репликации *rMB1* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID

16.

4. Конструкция ДНК по п.1 или 2, где:

a. промотор *rhaBAD* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 8 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 8;

b. активатор транскрипции RhaR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 9 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 9;

c. активатор транскрипции RhaS содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 11 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 11;

d. маркер резистентности к антибиотику представляет собой маркер резистентности к канамицину, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID 12 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 12;

e. промотор AmpR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 13 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 13;

f. терминатор *rrnB* T1 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 14 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 14;

g. терминатор *rrnB* T2 содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 15 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 15;

и

h. ориджин репликации *rMB1* содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 16 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 16.

5. Конструкция ДНК по любому из пп.1-4, где нуклеотидная последовательность,

кодирующая ранибизумаб, функционально связана с промотором *rhaBAD*.

6. Конструкция ДНК по любому из пп.1-5, где нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней.

7. Конструкция ДНК по любому из пп.1-6, где нуклеотидная последовательность, кодирующая ранибизумаб, содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 5, и/или (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь ранибизумаба, содержащую последовательность SEQ ID 6.

8. Конструкция ДНК по п.7, где нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, функционально связана в направлении транскрипции с любой одной или обеими из нуклеотидных последовательностей SEQ ID 5 и SEQ ID 6.

9. Конструкция ДНК по любому из пп.1-8, где сигнальный пептид представляет собой PelB.

10. Конструкция ДНК по п.9, где нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид PelB, содержит последовательность SEQ ID 7.

11. Конструкция ДНК по п.9 или 10, где указанная конструкция ДНК содержит последовательность SEQ ID 17 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно содержит последовательность SEQ ID 17.

12. Экспрессирующий вектор, содержащий конструкцию ДНК по любому из пп.1-11.

13. Бактериальная клетка-хозяин, содержащая конструкцию ДНК по любому из пп.1-11 или экспрессирующий вектор по п.12, где указанная бактериальная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку *Escherichia coli*, более предпочтительно клетку *E. coli* K-12.

14. Клетка-хозяин по п.13, где указанная клетка-хозяин содержит либо (i) хромосому, которая содержит мутацию в нуклеотидной последовательности гена *rhaB*, которая инактивирует RhaB, либо (ii) хромосому, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая RhaB, делетирована.

15. Клетка-хозяин по п.13 или 14, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, предпочтительно содержащую хромосому, которая

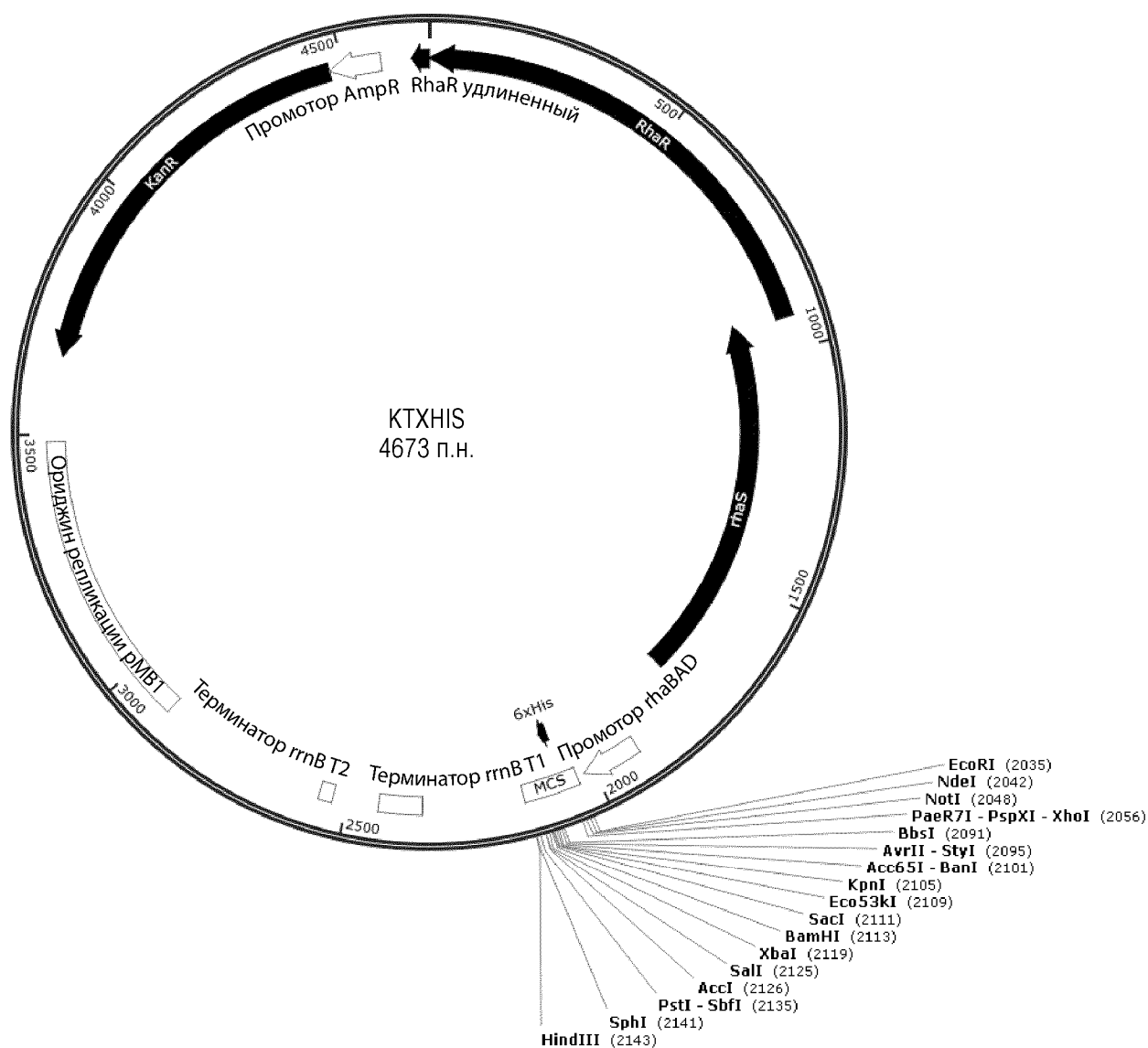
содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в нуклеотидной последовательности, кодирующей RhaB.

16. Клетка-хозяин по любому из пп.13-15, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli* W3110, содержащую хромосому, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID 2 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с ней, предпочтительно нуклеотидную последовательность SEQ ID 2; где необязательно хромосома клетки-хозяина дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую RhaT.

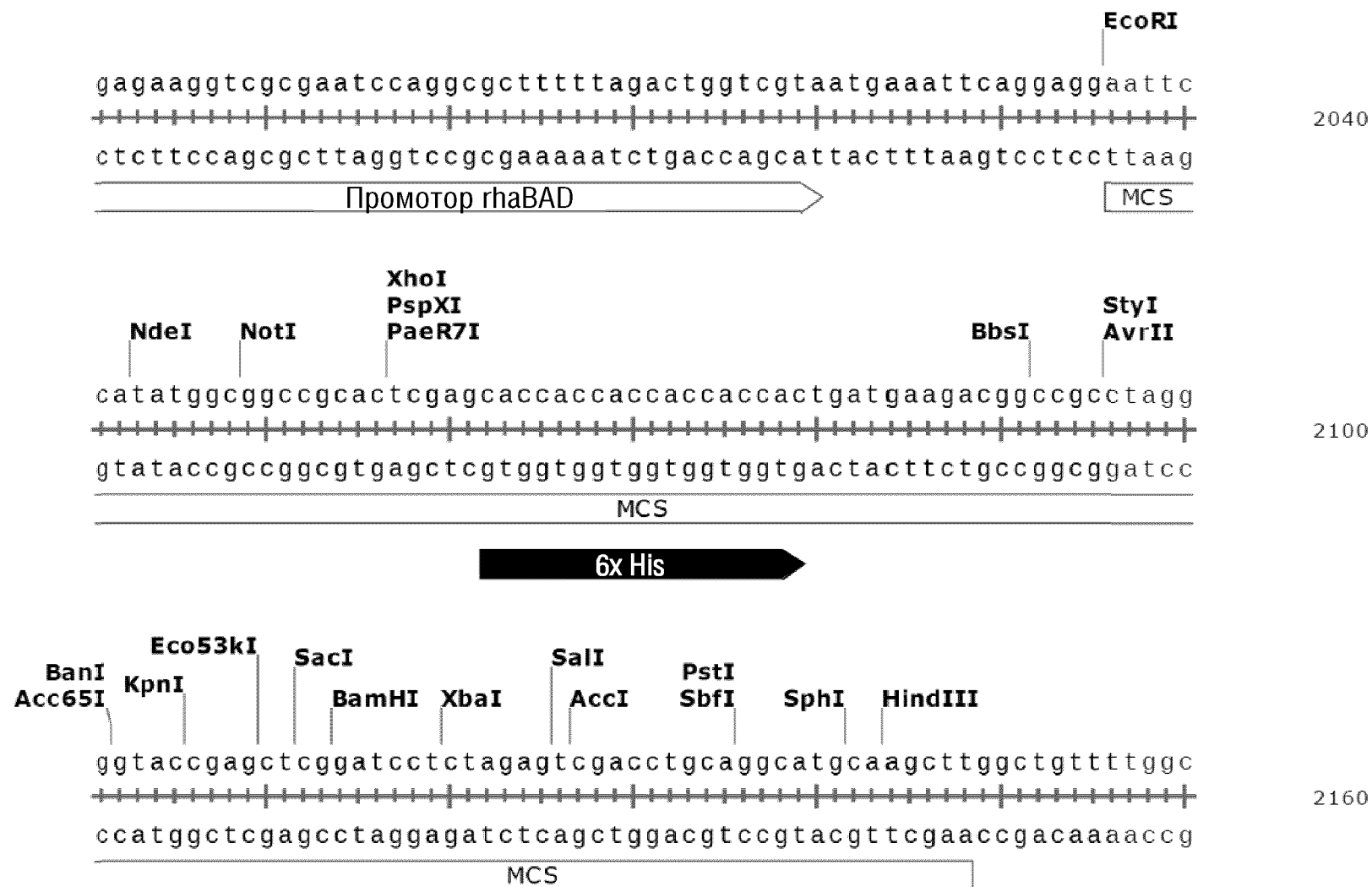
17. Способ продуцирования ранибизумаба, включающий стадию воздействия на бактериальную клетку по любому из пп.13-16 рамнозой, тем самым индуцируя экспрессию ранибизумаба.

18. Способ по п.17, дополнительно включающий стадию выделения ранибизумаба из бактериальной клетки-хозяина; необязательно дополнительно включающий одну или несколько стадию(й) очистки выделенного ранибизумаба, предпочтительно посредством одной или нескольких стадий хроматографии.

ФИГ.1

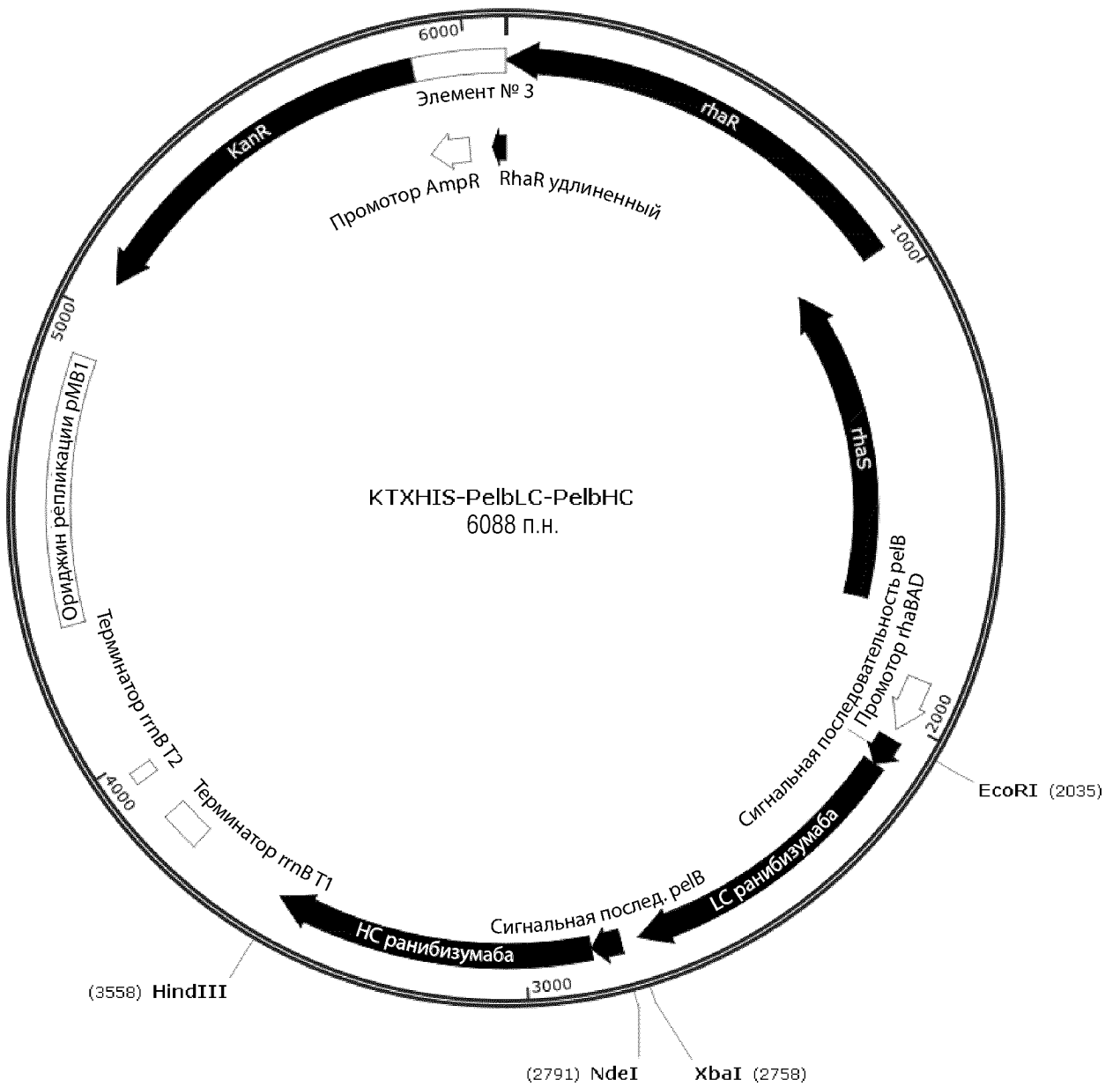


# ФИГ.2

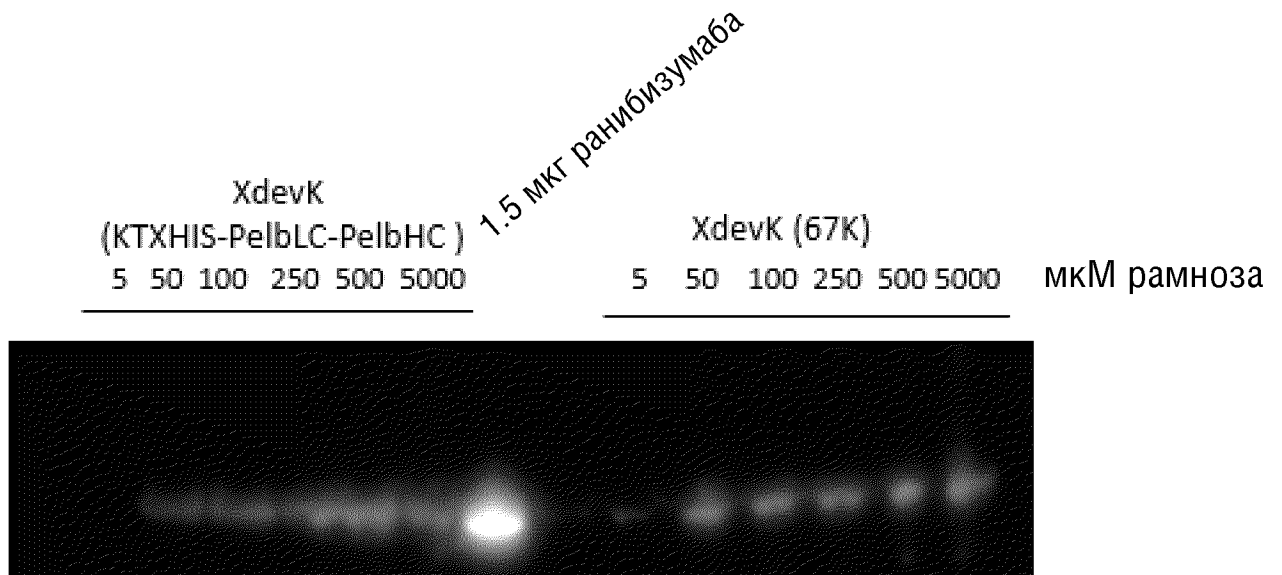


ФИГ.3

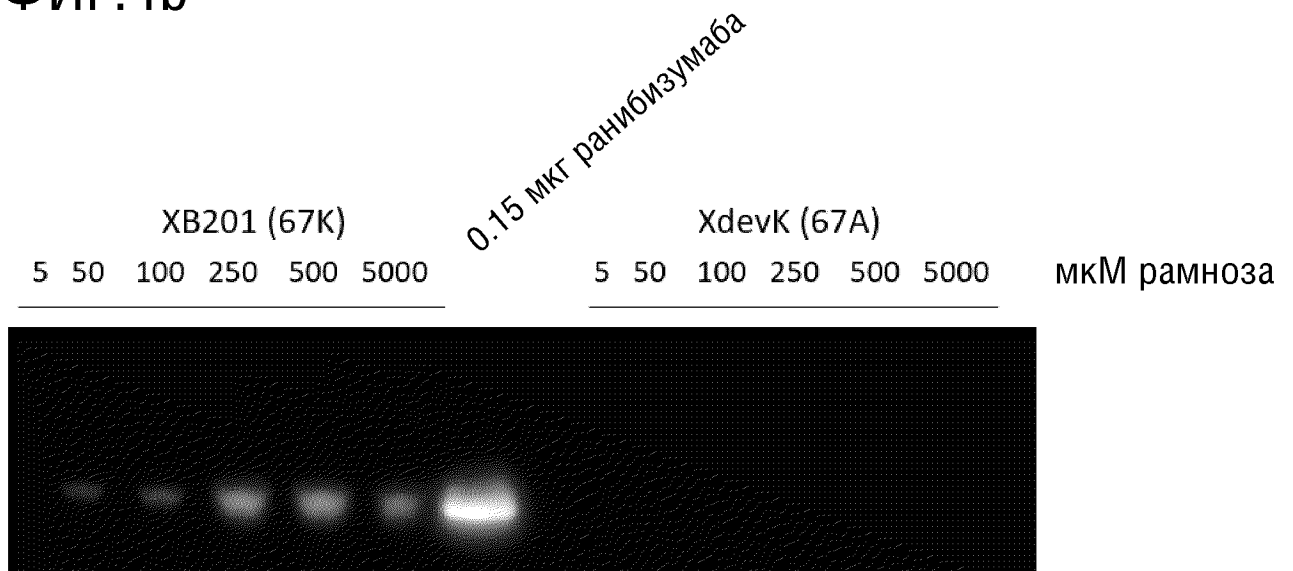
Created with SnapGene®



ФИГ.4а

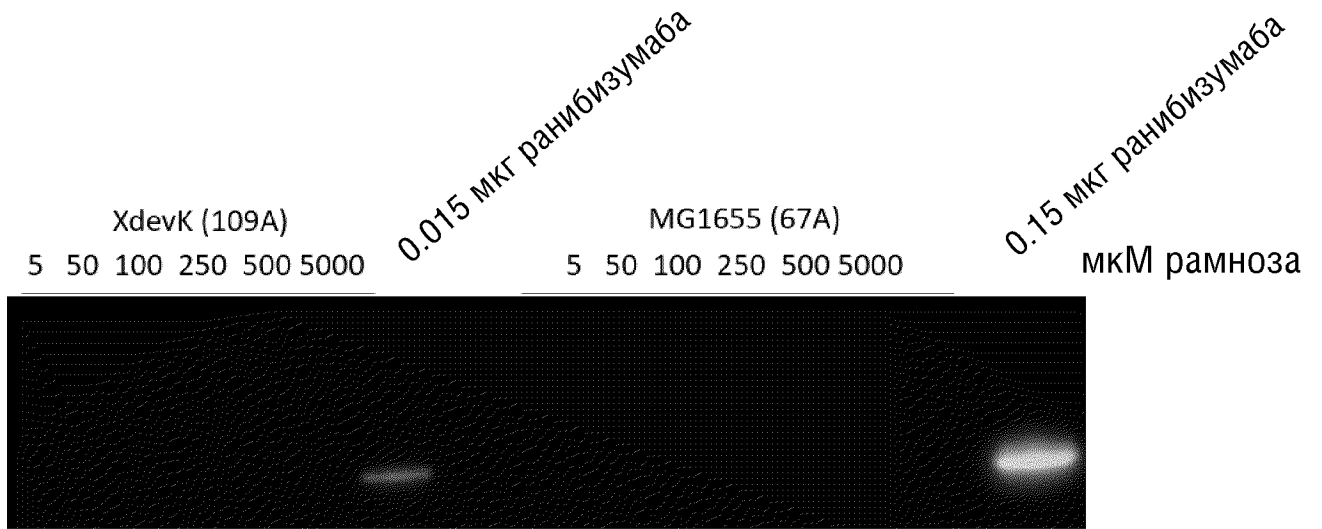


ФИГ.4b

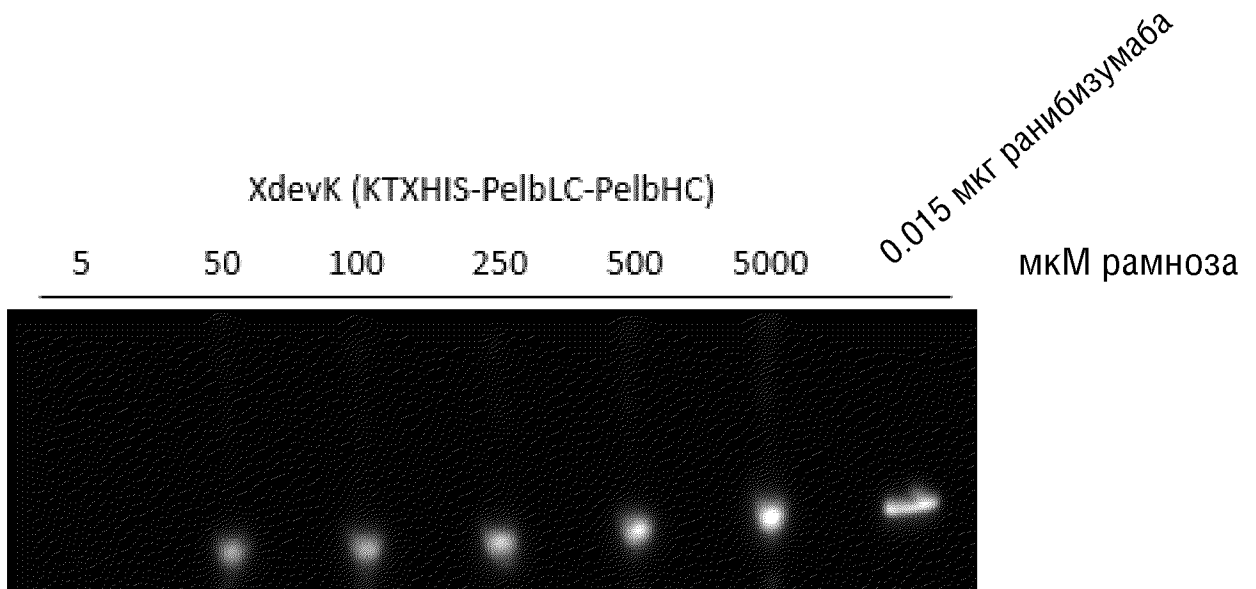




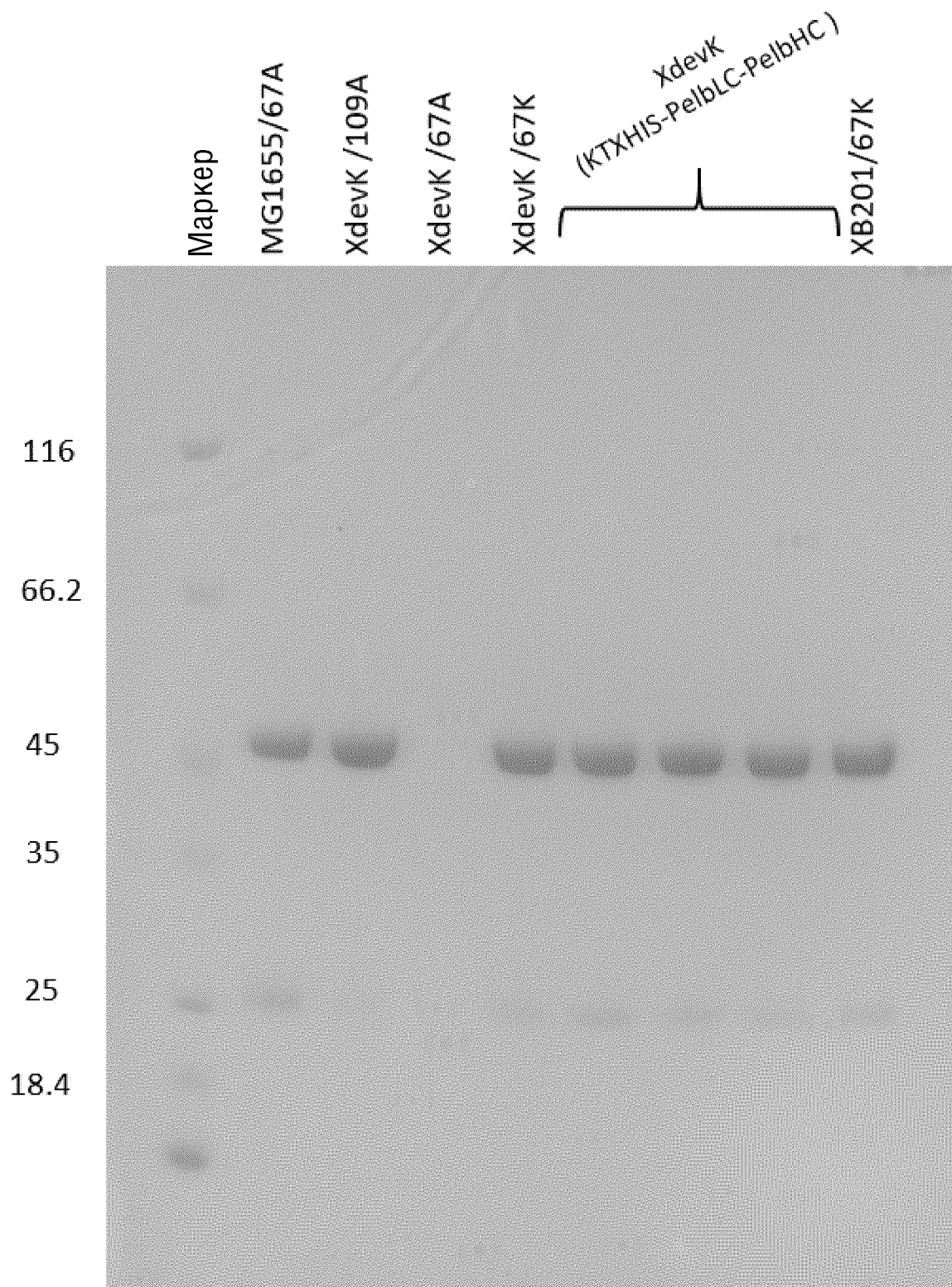
ФИГ.4с



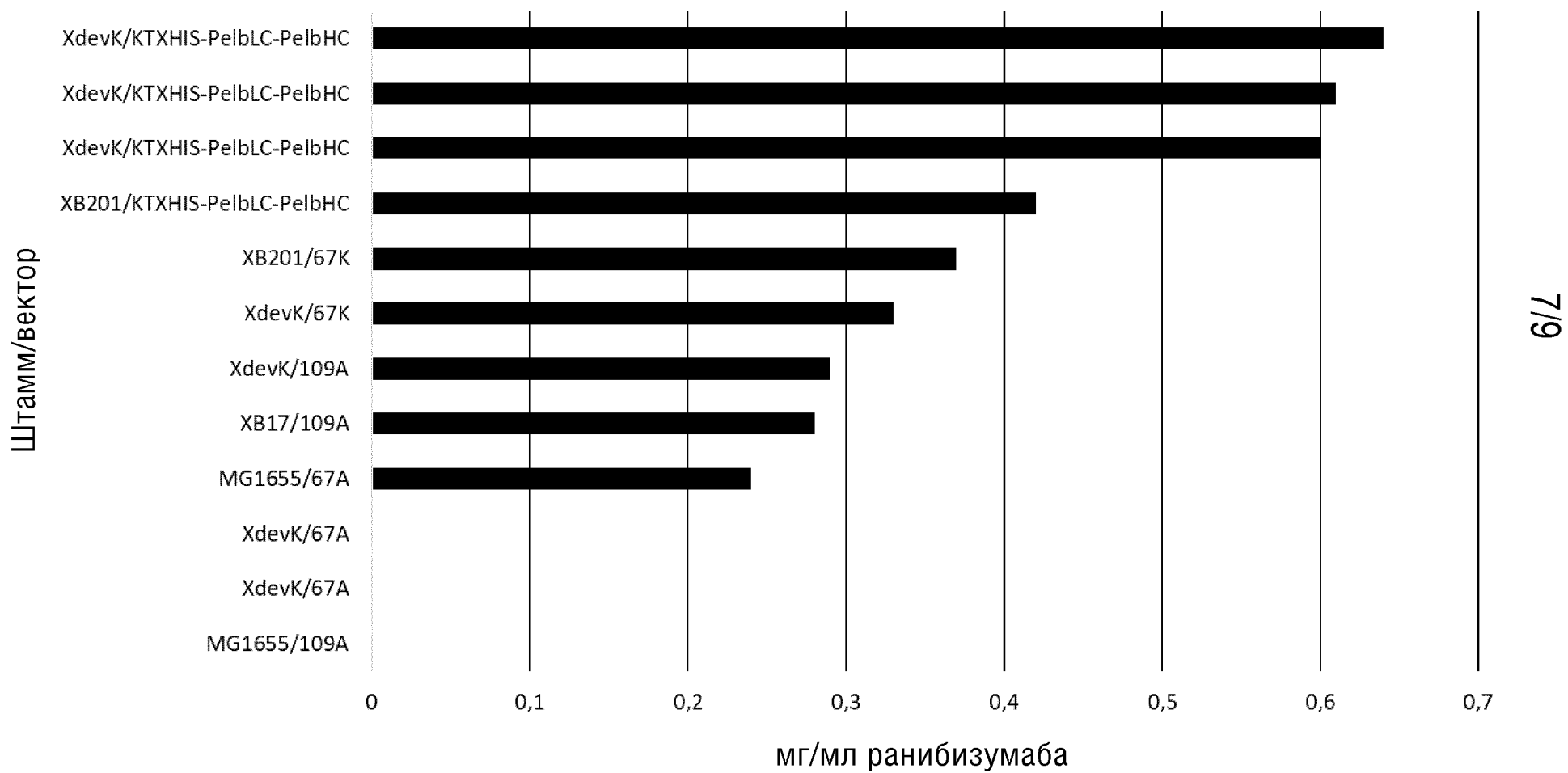
ФИГ.4d



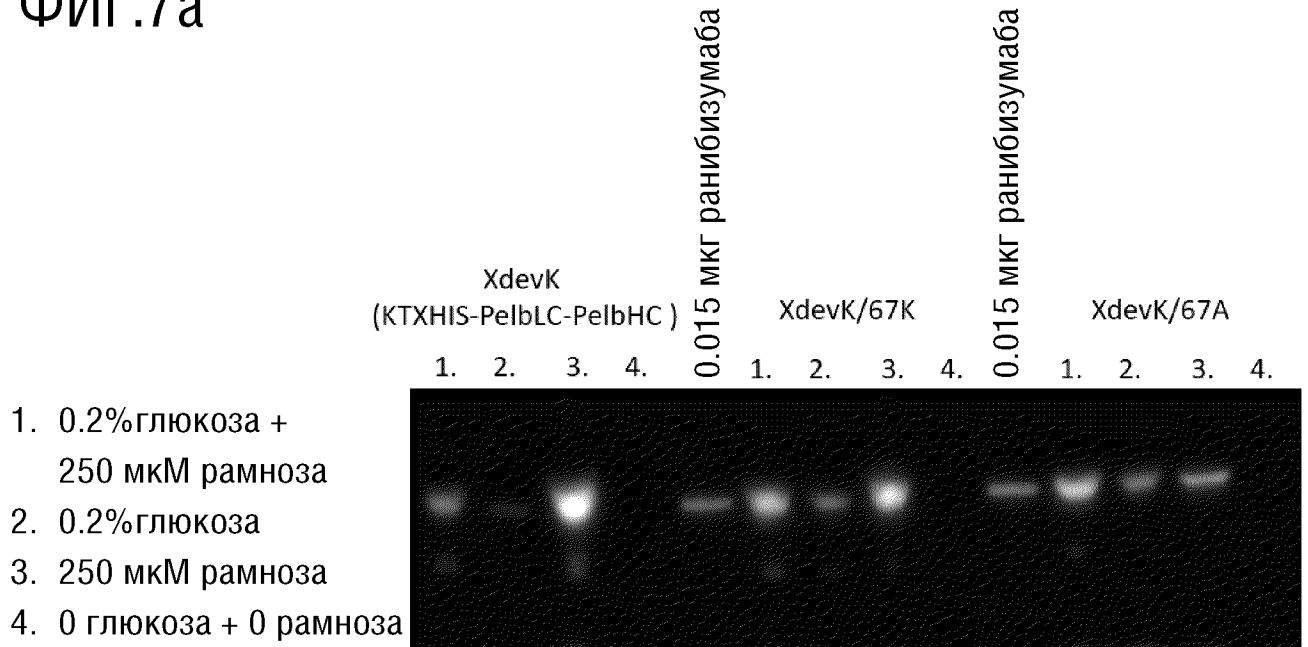
ФИГ.5



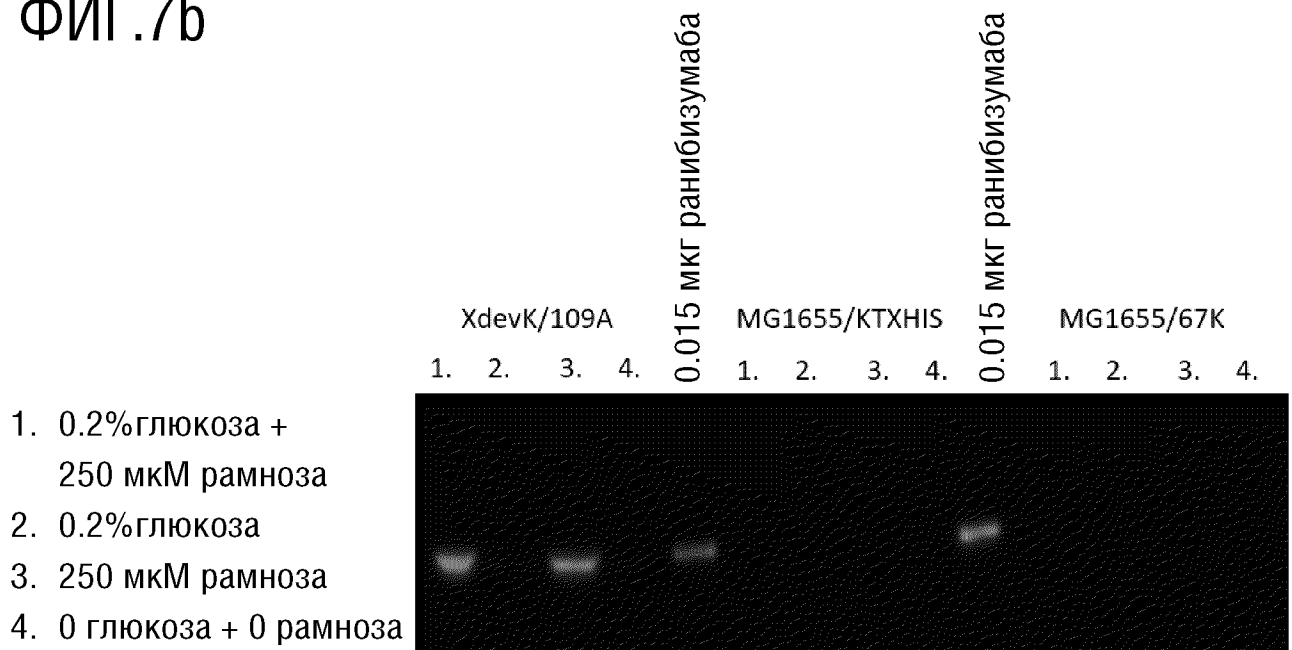
# ФИГ.6



ФИГ.7а



ФИГ.7b



## ФИГ.7с

