I485251

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I485251 B**

(45)公告日： 中華民國 104 (2015) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：099129401 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 08 月 31 日

(51)Int. Cl.： *C12P19/04 (2006.01)* *C08B37/10 (2006.01)*

(30)優先權：2009/09/01 美國 61/275,675

(71)申請人：瑞瑟勒綜合技術協會 (美國) RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE (US)
美國

(72)發明人：王振宇 WANG, ZHENGYU (CN)；林哈特 羅勃 J LINHARDT, ROBERT J. (US)；多迪克 強納森 S DORDICK, JONATHAN S. (US)；巴斯卡 悠傑沃 BHASKAR, UJJWAL (IN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 5550116A

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：12 共 52 頁

(54)名稱

Ｋ５肝素前體（ＨＥＰＡＲＯＳＡＮ）之醱酵及純化

K5 HEPAROSAN FERMENTATION AND PURIFICATION

(57)摘要

本發明係關於一種適於工業生產自大腸桿菌 K5 之醱酵培養物製備肝素前體(heparosan)之方法，其顯示優越的產率及純度、較小的培養體積、更快的生長、及較低的成本。

A method for the production of heparosan from fermentation culture of E. coli K5 suitable for industrial production, exhibiting superior yield and purity, smaller culture volumes, faster growth, and lower costs.

(無元件符號說明)

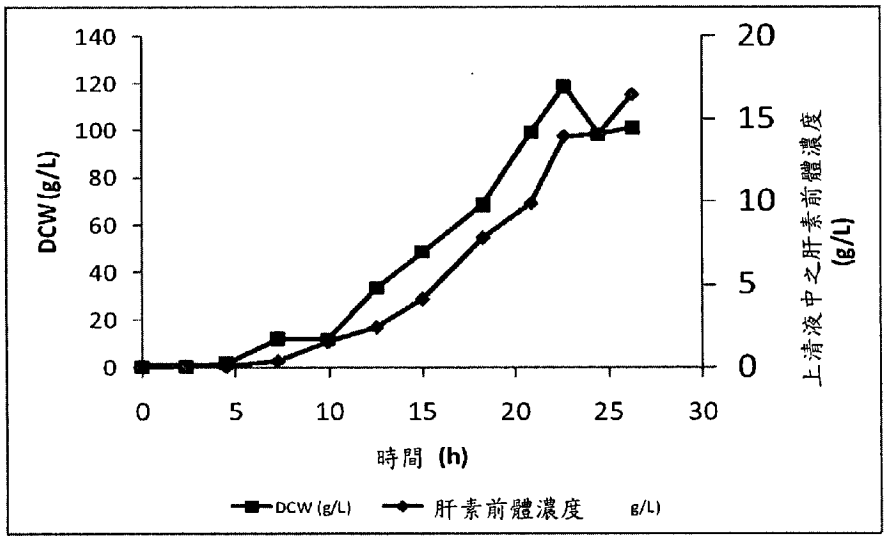
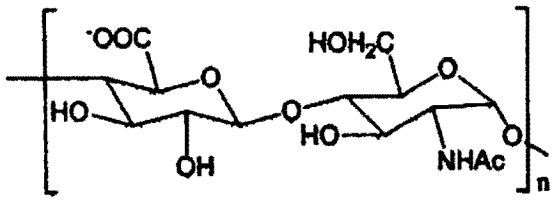

140
120
100
80
60
40
20
0
DCW (g/L)
20
15
10
5
0
上清液中之肝素前體濃度 (g/L)
0
5
10
15
20
25
30
時間 (h)
DCW (g/L)
肝素前體濃度
g/L)

圖 8

A


-OOC
HO
OH
O
O
HOH2C
HO
NHAc
O
n

六、發明說明：

本發明主張2009年9月1日申請之美國臨時專利申請案第61/275,675號之優先權，其將以全文引用的方式併入本文中。

本發明係在美國聯邦政府支持下，接受國家健康研究所提供之GM38060及HL096972補助而完成。美國聯邦政府擁有本發明中之某些權利。

【先前技術】

肝素及類肝素硫酸鹽係生物上重要的分子，其涉及抗凝血、病毒及細菌感染、血管生成、癌症及發展。Linhardt (2003)「Heparin: structure and activity」*J Med Chem*, 46: 2551-2554。Linhardt RJ, Toida T. (2004)「Role of glycosaminoglycans in cellular communication,」 *Acc Chem Res*, 37: 431-438。肝素之應用範圍寬廣，其包括手術、心肺氧合及腎透析、治療深部靜脈血栓症及急性冠心症。Linhardt「Heparin: an important drug enters its seventh decade.」 *Chem. Ind.* 2, 45-50 (1991)；Agnelli等人「Enoxaparin plus compression stockings compared with compression stockings alone in the prevention of venous thromboembolism after elective neurosurgery」 *N Engl J Med* 339 (2), 80-5 (1998)。亦可將肝素塗覆於血管及醫療儀器(如測試管及租用的透析機器)之表面，以形成抗凝血物表面。

目前，肝素係由動物組織製備，每年製造約100公噸之數量，但是此肝素可能受到其他生物產品污染。Linhardt

Chem. Ind. 2, 45-50(1991)。2008年，近100位美國人因肝素受到過硫酸化之硫酸軟骨素污染而身亡。Guerrini等人「Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events.」*Nature Biotechnology* 26, 669-675 (2008)。

天然真核細胞的肝素生物合成前體--肝素前體(heparosan)係一種具有重複雙醣單元之多醣，[→4)β-D-葡糖醛酸(GlcA)(1→4)*N*-乙醯基-α-D-葡糖胺(GlcNAc)(1→]$_n$，如圖1所示。

肝素前體亦可在細菌(包括大腸桿菌(*Escherichia coli*)K5及多殺性巴氏桿菌(*Pasteurella multicida*))中生物合成多醣莢膜。Lindahl U等人(1998)「Regulated diversity of heparan sulfate」*J Biol Chem* 273(39):24979-24982。據報導，K5肝素前體合成需要由2-酮基-3-去氧辛酮糖酸開始。Finke A等人(1991)「Biosynthesis of the Escherichia coli K5 polysaccharide, a representative of group II capsular polysaccharides: polymerization in vitro and characterization of the product」*J Bacteriol* 173(13):4088-94。隨後，經由乙二醇轉移酶KfiA及KfiC之交替作用(其將GlcNAc及GlcA添加至逐漸加長之多醣鏈之非還原端)加長K5肝素前體。Hodson N等人(2000)「Identification that KfiA, a protein essential for the biosynthesis of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide, is an alpha-UDP-GlcNAc glycosyltransferase. The formation of a

membrane-associated K5 biosynthetic complex requires KfiA, KfiB, and KfiC.」*J Biol Chem* 275(35):27311-5。一旦合成後，經由由六種蛋白質：KpsC、KpsD、KpsE、KpsM、KpsS及KpsT組成之途徑，將該肝素前體鏈運輸至細胞表面。McNulty C等人(2006)「The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in Escherichia coli: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell」 *Mol Microbiol* 59(3):907-22。咸信，經由多醣還原端之脂質取代大腸桿菌外膜中之磷脂酸分子，而使該K5肝素前體鏈錨定至該細胞表面上。Jann B, Jann K. (1990)「Structure and biosynthesis of the capsular antigens of Escherichia coli」 *Curr Top Microbiol Immunol* 150:19-42。經由K5肝素前體裂解酶(一種源自細菌噬菌體之酶，其透過β-消除機制裂解肝素前體鏈)之作用，一部份肝素前體多醣可自大腸桿菌K5脫落。Manzoni M等人(1996)「Production of K5 polysaccharides of different molecular weight by Escherichia coli」 *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 11(4):301-311。Manzoni M等人(2000)「Influence of the culture conditions on extracellular lyase activity related to K5 polysaccharide.」*Biotechnology Letters* 22(1):81-85。編碼K5裂解酶之基因係整合至大腸桿菌K5 DNA中且可誘導其表現。Manzoni M等人(2000) *Biotechnology Letters* 22(1): 81-85。K5裂解酶之活性可影響釋放至培養基中之肝素前

體之數量，及無論已與細胞結合或已釋放之肝素前體之結構及分子量性質(圖1B)。已評估K5肝素前體之M_w為20,000且由兩種主要子組分(M_w為16,000及1,500)組成。兩種子組分之比例對應於整體M_w，且受K5裂解酶之活性影響。Vann WF等人(1981)「The structure of the capsular Polysaccharide (K5 Antigen) of Urinary-Tract-Infective Escherichia-Coli 010-K5-H4-a Polymer Similar to Desulfo-Heparin」*European Journal of Biochemistry* 116(2):359-364；Manzoni (2000) *Biotechnology Letters* 22(1):81-85。

實驗室規模之研究已顯示，自大腸桿菌K5菌株獲得之重量平均分子量(M_w)>10,000之肝素前體可經酶轉化為類似肝素之抗凝血物多醣。Lindahl等人(2005)「Generation of「Neoheparin」from E coli K5 capsular polysaccharide」*J Med Chem* 48(2):349-352；Zhang等人(2008)「Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors」*Journal of the American Chemical Society* 130(39):12998-13007。肝素前體亦可用於各種應用中(WO 2009/014559)。

本發明描述一種適於工業生產肝素前體之大腸桿菌(*E.coli*)K5醱酵之方法，其具有肝素前體之高產率及有效回收高純度肝素前體。

【發明內容】

本發明係關於一種藉由大腸桿菌(*E.coli*)K5之醱酵、單離K5多醣、及純化法來製備肝素前體(heparosan)之改進方

法。

在一項實施例中，該方法包括(a)於具有葡萄糖作為主要碳源之限制培養基中培養大腸桿菌K5；(b)將肝素前體結合至固相，隨後洗脫；及(c)使肝素前體自洗脫液中沈澱。該方法適於製備實質上純的肝素前體，其係至少90%純度。

在相關實施例中，該方法包括兩個培養階段，亦即分批生長階段及分批補料生長階段，其中(a)用於該分批生長階段之培養基包括(每公升)約20 g葡萄糖、10至300 mg硫胺素、約13.5 g KH_2PO_4、約4.0 g $(NH_4)_2HPO_4$、約1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、約1.7 g檸檬酸、及(每公升)約10.0 mL微量金屬溶液；其中該微量金屬溶液基本上由(每公升5 M HCl) 10.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成，且其中；(b)用於該分批補料生長階段之進料溶液由(每公升)250至1000 g葡萄糖、約20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$及0.15-0.5 g硫胺素、及視情況選用之約47 g KH_2PO_4組成。

在相關實施例中，藉由噴布空氣提供氧氣。可在空氣中補充氧氣。較佳地，溶氧保持在約20%。在某些實施例中，使用純氧。

在其他相關實施例中，該等條件包括溫度保持在約37℃，且pH保持在約7。可藉由添加氨溶液或氨氣保持pH。在某些實施例中，該氨溶液係約25至35%，其包括約

30%，如29%。

在特定實施例中，將用於該分批補料階段之進料培養基係依如下決定之速率饋入：

$$Ms(t)=F(t)S_{F(t)}=\left(\frac{\mu}{Y_{\frac{x}{s}}}+m\right)X(t_0)V(t_0)\exp\left[\mu(t-t_0)\right]$$

其中，MS係碳源之質量流速(g/h)；F係進料流速(L/h)；S_F係進料中之碳受質濃度(g/L)；X係細胞濃度(g/L dcw)；m係比維持係數(g/g dcw/h)；V係培養體積(L)；t_0係饋入開始時間；t係處理時間；μ係比生長率(h^{-1})；及$Y_{x/s}$係碳受質上之細胞產率(g/g)。

該方法亦包括自該培養基中結合並洗脫肝素前體。在一項實施例中，自無細胞之上清液獲得肝素前體。在另一項實施例中，藉由用清潔劑溶液(如SDS(例如，1% SDS))在攪拌下清洗，自細胞獲得肝素前體。

移除該等細胞後，結合及洗脫法可包括使陰離子交換樹脂與該培養上清液混合，並移除該上清液，用含於pH 4之乙酸鈉緩衝液中之50 mM氯化鈉清洗該樹脂，用含於pH 4之乙酸鈉緩衝液中之1 M氯化鈉洗脫。

或者，可用殼聚糖進行結合及洗脫。在一項實施例中，將該培養上清液與殼聚糖溶液混合，讓其沈澱。將該沈澱單離、清洗(如用水或其他稀緩衝液)、並用強鹼(如約1 M NaOH)洗脫。除陰離子交換外，亦可使用殼聚糖進行結合及洗脫。

結合及洗脫之後，使用如乙醇或甲醇使該肝素前體自該洗脫液沈澱。在一項實施例中，使用3體積之乙醇。通常清洗並乾燥所得之沈澱。

該方法亦包括視情況之除熱原步驟，如藉由氧化，包括使用過氧化氫。

本發明方法可以小培養體積，以短期間得到高產率、高純度、及低量污染物之肝素前體。因此，本發明適於工業生產肝素前體。可在短於60小時、短於48小時、及短於40小時醱酵(不包括菌元(starter)培養之生長)中獲得肝素前體之產物。在其他實施例中，在分批階段初始培養體積係3 L，在補料階段操作至7 L，且比例類似。因此，在相關實施例中，該培養生產至少10 g/L、至少11 g/L、至少12 g/L、至少13 g/L、至少14 g/L、及至少15 g/L之肝素前體。該實質上純肝素前體純度係至少90%、至少95%、至少97%、或至少99%。在相關實施例中，該肝素前體係低於1%DNA及低於2%蛋白質。該肝素前體適於加工成肝素。在一項實施例中，該肝素前體具有至少10、20、30、40、50、或60 kDa(如約58 kDa)之數量平均分子量；至少20、30、40、50、60、70、80或90 kDa(如約84 kDa)之重量平均分子量，及多分散性指數(PDI)低於2.0，包括低於1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、或1.3，包括約1.4。

在其他實施例中，本發明包括由上述方法製備之肝素前體於醫藥製劑之用途，如醫療儀器之塗層。在相關實施例中，該肝素前體係用於製備肝素。相關地，本發明係一種

使用由上述方法製備之肝素前體或肝素製造藥物之方法。

在其他實施例中，本發明係藉由上述方法製備之肝素前體，其包括純度至少90%、至少95%、及更高純度之肝素前體。在相關實施例中，本發明係自該肝素前體製得之肝素。

【實施方式】

定義

肝素前體係具有重複雙醣單元之多醣[GlcAα-(1-4)GlcNAcR(1-4)]$_n$。因為K5胞外多醣係由肝素前體(其由本發明者單離並純化)製成，所以在某些情況下，「肝素前體」可係指存在於培養基中且在單離及純化期間，與細菌結合之肝素前體。肝素前體之定義係熟悉相關技藝者咸瞭解。

大腸桿菌(*Escherichia coli*)K5描述產生K5胞外多醣之大腸桿菌之變種。適宜的大腸桿菌K5菌株可自公開保存處(如ATCC(美國菌種保存中心，USA))獲得，如大腸桿菌菌株ATCC23506。亦可自臨床來源中單離，及/或基因改造大腸桿菌K5菌株。

本文使用之「醱酵」係指細菌生長並產生胞外多醣，特別係K5胞外多醣。

本文使用之「單離」意指自培養基及細菌細胞分離肝素前體，且肝素前體之存在數量應足以供識別或使用。

本文使用之「實質上純」意指該肝素前體基本上不含其它物質，其純度達到適合其預期用途操作之程度。實質上

純的肝素前體純度係至少90%。較佳地，該物質中超過91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或甚至超過99%不含污染物。可藉由相關技藝已知之方法評估純度程度。

除非特別注明僅表示一個(種)，否則本文使用之「一」意指一或多個(種)。

如熟習此項技術者所理解般使用術語「約」，上下文中該「約」修飾該指定術語。對於數值而言，可將「約」視為包括規定值10%左右之變化。

用於製備肝素前體之大腸桿菌K5之醱酵法

在確定適當的醱酵條件時，必須考慮諸多因素。

大腸桿菌一般可在各種培養基及寬廣範圍之pH、溫度、O_2及其他條件下生長。然而，不同於實驗室適應的菌株，尚未對大腸桿菌K5進行遺傳學、生長及功能之廣泛研究。

生長條件中之變化可影響(a)細菌生長速率；(b)最大細胞密度；(c)K5胞外多醣莢膜之產生；(d)由大腸桿菌K5、存在大腸桿菌K5內之噬菌體、及其他因素修飾K5莢膜之程度；(e)K5胞外多醣莢膜至培養基之釋放；(f)所產生之肝素前體多醣大小是否在適於加工成肝素之尺寸範圍內；及(g)污染物之數量及種類。例如，促進細胞裂解之條件雖然可增加培養上清液中之K5胞外多醣之產率，但是亦可增加K5胞外多醣莢膜之降解及上清液中之污染物之數目及數量。

任一種污染物之重要性係與可藉由隨後之純化及處理步

驟移除之難易性、該污染物是否干擾隨後之肝素前體加工成肝素、及且該污染物是否對人類或動物存在危險有關。大腸桿菌K5係已知病原體，且因此必須清除毒素及其他毒性相關之因素。脂多醣(LPS)係革蘭氏陰性菌提取物之常見污染物且稱為強效免疫刺激劑及毒素。核酸亦可能具免疫刺激性。LPS及核酸均具有多醣核心，且因此可與肝素前體共同純化。其他污染物可包括非肝素前體之多醣或肝素前體之衍生物。

爲製備醫藥及醫學產品，生長培養基之來源及性質可能重要。例如，藉由動物或植物蛋白質之水解獲得之複合培養基極適合大腸桿菌K5生長並製造，但是其在批料間出現差異且可含有抗原及其他污染物。

對於以工業規模生產肝素前體時，必須考慮其他因素，包括培養體積、時間、及醱酵溫度。因此，需要較小的培養基體積、及較快速的生長條件。亦相關的係確定可使用普遍可取得之標準化且廉價之原料之生長培養基。

亦必須證明生長條件係可調整規模。因此，在5 ml培養物下確定之最佳條件亦必須證明可用在更大規模(如5 L、20 L、100 L、及更多)下。相關地，該方法應穩固且可具有在現性，及因此對於條件中之小變化不敏感。

考慮到上述情況，適於肝素前體之工業生產之條件之確定並不複雜。本發明者已確定用於大腸桿菌K5之適宜生長及培養條件，以利於適於工業生產之肝素前體之製備、單離及純化。

該培養基係用葡萄糖作為碳源之限定培養基，其根據生長階段變化。用於分批生長之培養基之組成如下(每公升)：約20 g葡萄糖、10-300 mg硫胺素、約13.5 g KH_2PO_4、約4.0 g $(NH_4)_2HPO_4$、約1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、約1.7 g檸檬酸、及約10.0 mL微量金屬溶液。該微量金屬溶液由(每公升5M HCl)10.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成。在該分批補料培養期間之進料溶液係由(每公升)以下組成：250至1000 g葡萄糖、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$及0.15至0.5 g硫胺素，且可用47g KH_2PO_4進一步補充。在某些實施例中，該進料溶液係700 g葡萄糖、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$及0.2 g硫胺素。在另一項實施例中，該進料溶液係700 g葡萄糖、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、47 g KH_2PO_4及0.4 g硫胺素。

於錐形瓶中，在37℃下，藉由使大腸桿菌K5菌株生長過夜來製備種子培養物。隨後，將該種子培養物接種至醱酵槽中。該醱酵槽中之醱酵包括兩個階段：分批生長階段、及利用指數進料及DO-靜態之進料策略組合之階段。該分批生長階段係在將該種子培養物接種至該醱酵槽之後開始。溫度保持在約37℃，且當pH下降時，則添加NH_4OH，使pH保持在6與8之間。

該第二醱酵階段係在溶氧出現急劇增加之後且培養基中之葡萄糖耗盡時開始。一般根據以下公式(但是有變化彈性)計算葡萄糖之進料速率：

$$M_s(t) = F(t)S_F(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m\right)X(t)V(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m\right)X(t_0)V(t_0)\exp[\mu(t - t_0)]$$

其中：Ms係碳源之質量流速(g/h)；F係進料流速(l/h)；SF係進料中之碳受質濃度(g/l)；X係細胞濃度(g/l dcw)；m係比維持係數(g/g dcw/h)；V係培養體積(l)；t0係饋入開始時間；t係處理時間；μ係比生長率(h^{-1})；及Yx/s係碳受質上之細胞產率(g/g)。

在整個補料過程中，μ係設定在0.1至0.4。

在某些實施例中，補料期間可能暫停作為檢驗點，以確保沒有過量饋入葡萄糖及該培養基中之有毒物質(如乙酸鹽)較少。在該等檢驗點中，在觀測到溶氧濃度急劇增加(其指示培養基中之葡萄糖耗盡)之後，重新開始進料。在較大規模中，醱酵期間用探針、或用自動取樣及分析連續進行此等觀測。

通常情況下，持續進行醱酵直至沒有觀測到細胞密度增加為止。隨後，停止進料並使該醱酵槽之攪拌器保留30至60分鐘以上，以剪切掉細胞表面上更多莢膜K5多醣並使其進入培養基中。

自醱酵培養物之肝素前體之純化法

在一項示例性實施例中，肝素前體之純化可包括(a)製備培養物上清液或濾液之步驟；(b)將肝素前體結合至固相，如樹脂，並自其洗脫肝素前體；(c)用醇沈澱；及(d)除熱原。可增加其他結合、沈澱及除熱原之步驟。

在步驟(a)中，將該培養物離心或過濾，以自細胞集結塊

分離上清液。可將福爾馬林或其他試劑添加至該培養物中，以滅活細菌細胞。通常，自該上清液中回收肝素前體，但是亦可藉由清洗該等細胞(包括用清潔劑(如十二烷基硫酸鈉))並機械攪拌，接著離心集結成塊，並自該上清液提取肝素前體回收。

在步驟(b)中，將該肝素前體結合至優先結合肝素前體之固相中。例如，將樹脂(如，陰離子交換樹脂)添加至來自步驟(a)之上清液中。攪拌該混合物，以使該上清液中之肝素前體結合在該樹脂上。隨後，過濾該混合物，以自該溶液中分離該樹脂。隨後清洗該分離之固體，以沖洗未結合之污染物並洗脫。

對於陰離子交換樹脂而言，此將包括用低鹽濃度之溶液清洗，以沖洗未結合之污染物，並用1至2 M氯化鈉溶液洗脫。亦可使用殼聚糖以結合肝素前體。雖然可呈溶液形式添加殼聚糖，且因此其不呈「固相」，但是其自該上清液沈澱出來並藉此攜帶著肝素前體。類似地，肝素前體可流經含固相之適當管柱，經清洗並洗脫。

在步驟(c)中，將來自步驟(b)之所得肝素前體洗脫液沈澱，如添加1至5體積份之乙醇或甲醇。此步驟不僅使肝素前體濃縮，而且選擇性除去污染物。隨後，藉由離心分離該沈澱，並用50至80%醇清洗。

在步驟(d)中，將該沈澱溶於水中，並進行除熱原步驟，以滅活餘下之脂多醣及其他污染物。通常，用氧化劑(如過氧化氫，但是其他已知過氧化物或漂白劑亦可)進行

此步驟。將所得之肝素前體再次如上沈澱，並乾燥。

分析

分析所得之肝素前體，以測定產率、純度及進一步處理之適用性。可使用數種分析工具。

在該肝素前體之部份消化之後，可用高效液相層析(HPLC)-電噴霧電離(ESI)-質譜(MS)分析雙醣組成。Bhattacharyya S等人(2010)「Cell-bound IL-8 increases in bronchial epithelial cells after arylsulfatase B silencing due to sequestration with chondroitin-4-sulfate,」 *Am J Respir Cell and Molec Biol* 42, 51-61。^{1}H-NMR及^{13}C-NMR亦可用於未消化之肝素前體且係適於測定肝素前體之濃度及純度。Wang Z、Zhang Z、McCallum SA、Linhardt RJ. 2009。以核磁共振定量法監測肝素前體K5莢膜多醣之產生。Anal Biochem. 398(2):275-7。亦可用咔唑分析法測定肝素前體，如Bitter T, Muir HM (1962)「A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction.」 *Analytical Biochemistry* 4(4):330中所指出。

可藉由UV吸光度測定DNA含量。可用已熟知之套組(如微BCA蛋白質檢測套組)，根據製造商之說明測定蛋白質含量。

藉由與已知分子量之肝素前體或透明質酸之分子量梯度比較，測定經純化之肝素前體之分子量曲線，且用於計算平均分子量、數量、及分佈。

可用鱟變形細胞溶菌液(LAL)檢測法測定熱原含量。

可藉由參考以下實例進一步理解本發明，所提供之實例係闡述某些本發明實施例且不希望限制。熟習此項技術者將瞭解，在不偏離本發明之精神下可進行變化。

實例

實例1

材料

使用購自Applikon (Schiedam, Netherlands)之7-L玻璃可高熱殺菌之生物反應器作為該醱酵槽。使用BioXpert V1.5軟體控制醱酵槽操作及收集資料。Difco™ LB培養液粉末係購自BD (Franklin Lakes, NJ)。用於製備該合成培養基之大多數化學品係購自Sigma-Aldrich (St Louis, MO)。消泡劑204係購自Sigma-Aldrich (St Louis, MO)。有折流板振盪瓶係購自Corning(Corning, NY)。購自GE Healthcare (Piscataway, NJ)之DEAE瓊脂糖Fast Flow係用於純化肝素前體。Vivapure D Mini H旋轉管柱係購自Sartorius Stedim Biotech (Aubagne, France)。微BCA蛋白質檢測套組係購自Thermo Scientific (Rockford, IL)。使用於雙醣分析之用於消化肝素前體之酶係在實驗室中表現並純化，如Han等人(2009)「Structural snapshots of heparin depolymerization by heparin lyase I」 *J Biol Chem* 284(49): 34019-27中所述。在Agilent 1100儀器(Santa Clara, California)上進行HPLC-MS。TLC矽膠板係購自EMD (Gibbstown, NJ)。用於製備肝素前體Mw梯度及測定肝素前體Mw之材料係詳細描述於Ly M, 等人(2010)「Analysis of E. coli K5 capsular

polysaccharide heparosan」*Anal Bioanal Chem* (DOI: 10.1007/s00216-010-3679-7)中。Select_HA™ LoLadder(一套透明質烷分子標記)係購自Hyalose (Oklahoma City, OK)。

大腸桿菌K5於2.8 L振盪瓶中之生長

將來自美國菌種保存中心之大腸桿菌K5(ATCC #23506)冰凍儲存於1 mL含有25%甘油之M9、LB、甘油及葡萄糖培養基中。用0.5 mL解凍之大腸桿菌接種含有25 mL相同培養基之250 mL振盪瓶中。在指數生長後期，當乾細胞重約1.1 g(DCW)/L(針對M9培養基培養物)、5.4 g DCW/L(針對甘油合成培養基)、5.6 g DCW/L(針對葡萄糖合成培養基)、及1.9 g DCW/L(針對LB培養基)時，收穫該培養物。在2.8 L振盪瓶中接種5體積%處於指數生長後期之細胞後，使大腸桿菌K5培養物(300 mL)進行下一步生長。在220 RPM及37℃下振盪該培養物，直至生長達到穩定階段後的1至4 h，且隨後收穫用於回收肝素前體。用於2.8 L振盪瓶醱酵之培養基包括：**1.** LB培養基：Difco™ LB培養液，Lennox，20 g/L。**2.** M9培養基：2 g/L葡萄糖、0.12 g/L $MgSO_4$、0.011 g/L $CaCl_2$、0.337 g/L硫胺素-HCl、6 g/L Na_2HPO_4、3 g/L KH_2PO_4、0.5 g/L NaCl、1 g/L NH_4Cl。**3.** 甘油限定之培養基：20 g/L甘油、20 mg/L硫胺素、13.5 g KH_2PO_4、4.0 g $(NH_4)_2HPO_4$、1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1.7 g檸檬酸、及10.0 mL微量金屬溶液。微量金屬溶液由(每公升5 M HCl)10.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成。Wang FL、Lee SY (1998)「High cell density culture of metabolically engineered Escherichia coli for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium」*Biotechnology and Bioengineering* 58(2-3):325-328。**4.** 葡萄糖限定之培養基：(每公升)20 g葡萄糖、20 mg硫胺素、13.5 g KH_2PO_4、4.0 g $(NH_4)_2HPO_4$、1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1.7 g檸檬酸、及10.0 mL微量金屬溶液。微量金屬溶液由(每公升5 M HCl)10.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成。Wang及Lee (1998)，如上所述。

大腸桿菌K5於7 L醱酵槽中之生長

此醱酵由分批生長階段及分批補料生長階段組成。用於該醱酵中之分批生長階段之培養基之組成係：(每公升)20 g葡萄糖、20 mg硫胺素、13.5 g KH_2PO_4、4.0 g $(NH_4)_2HPO_4$、1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1.7 g檸檬酸、及10.0 mL微量金屬溶液。微量金屬溶液由(每公升5 M HCl)10.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成。用於該分批補料階段之進料溶液由以下組成(每公升)：700 g葡萄糖、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$及0.2 g硫胺素。Wang及Lee (1998)，如上所述。

該分批生長階段係在接種自指數生長後期之振盪瓶所獲得之種子培養物(300 mL 5.6 g/L DCW)後開始。溫度保持在~37℃，及pH係保持在約7(藉由添加29%氨溶液)。將空氣噴入該醱酵槽中，以提供氧氣，且該攪拌器速度設定為520 RPM。

該醱酵之第二階段係在該分批生長培養基中之葡萄糖已耗盡且溶氧出現急劇增加之後開始。隨後，根據以下公式1依指數方式饋入進料溶液：

(1)

$$Ms(t)=F(t)S_{F(t)}=\left(\frac{\mu}{Y_{\frac{x}{s}}}+m\right)X(t_0)V(t_0)\exp\left[\mu(t-t_0)\right]$$

Ms係碳源之質量流速(g/h)；F係進料流速(L/h)；S_F係進料中之碳受質濃度(g/L)；X係細胞濃度(g/L dcw)；m係比維持係數(g/g dcw/h)；V係培養體積(L)；t_0係饋入開始時間；t係處理時間；μ係比生長率(h^{-1})；及$Y_{x/s}$係碳受質上之細胞產率(g/g)。Lee SY. 1996「High cell-density culture of *Escherichia coli*」*Trends Biotechnol* 14(3):98-105。在此研究中，使用0.10至0.15 h^{-1}之間的μ值，以便有足夠的細胞增殖，同時避免由於較高生長速率所造成毒性副產物之累積。附接至該醱酵槽之「酸泵」係用於執行葡萄糖饋入之功能，而非添加真正的酸，且該鹼泵係用於添加29%氨溶液，以保持安定的pH，並對該培養物提供氮源。第三泵係當泡沫超過回饋循環經由該醱酵槽之數位控制單元所控制之設定水準時，用於將消泡劑204試劑添加至該培養物

中。藉由設定該「酸泵」開關時間為一分鐘來達到葡萄糖-饋入速率。在經過醱酵時間7 h與24 h之間，使用公式：T_{on}=0.72* exp[0.0023*(t-420)]，其中T_{on}係在一分鐘期間內打開該「酸泵」一秒鐘之時間。一旦觀測到氧氣受限制，即在24 h後降低葡萄糖饋入速率。使用鹼泵來添加29%氫氧化銨溶液手動控制pH。使用寫入BioXpert V1.5軟體中之訂製程式更密切控制pH。當溶氧下降到低於20%空氣飽和度時，提高攪拌器速度及/或氣流速率。在24 h醱酵時間後，將純氧與空氣混合，來提供足夠的溶氧。定期停止饋入葡萄糖，以確保該等細胞消耗全部葡萄糖，且有毒副產物(如乙酸鹽)不會在培養基中累積。當觀測到溶氧出現尖峰(其表示葡萄糖已耗盡及形成有毒副產物)後，重新開始進料。Johnston WA等人(2003)「Tracking the acetate threshold using DO-transient control during medium and high cell density cultivation of recombinant Escherichia coli in complex media」*Biotechnol. Bioeng* 84(3):314-23。自該醱酵槽中定期收集樣品。將所取樣品在12,000 x *g*下離心30 min，以自大腸桿菌細胞分離上清液。

測定該醱酵上清液中之肝素前體濃度

藉由吓唑分析及NMR分析兩者測定該醱酵上清液中之肝素前體濃度。在肝素前體之吓唑檢測中，將離心回收之0.5 mL醱酵上清液加至Millipore YM-3脫鹽旋轉管柱(1200 ×*g*)中，以移除鹽類及小分子。將含有粗製肝素前體之滯留物回收並凍乾。用0.5 mL蒸餾水復水該乾燥粗製肝素前

體，並使其接受咔唑檢測。自使用純肝素前體製備之標準曲線計算肝素前體之濃度。在NMR檢測中，將同樣自培養上清液回收之肝素前體(1 mL)凍乾，且隨後溶於400 μL含有71 μg對苯二甲酸鈉(內標準物)之D_2O中，隨後轉移至NMR管中，用於測定600 MH_Z之^{1}H-NMR。自肝素前體中之N-乙醯基之積分面積與內標準物之積分面積之比例計算肝素前體之濃度。

在醱酵期間快速回收肝素前體樣品用於分析

自醱酵上清液快速回收肝素前體並使用Vivapure D Mini H旋轉管柱進行部份純化。將藉由離心(12,000×*g*)自細胞回收之上清液(1 mL)與1 mL緩衝液A(50 mM氯化鈉、20 mM乙酸鈉，pH 4)混合。隨後，將該混合物調整至pH 4，且裝載在經預平衡之Vivapure D Mini H管柱上。隨後，用緩衝液A清洗該管柱並用緩衝液B(1 M氯化鈉、20 mM乙酸鈉，pH 4)洗脫。隨後，用3倍體積之乙醇，使洗脫之樣品，在-20℃下(於防爆冷櫃中)，靜置過夜而沉澱，且隨後用75%乙醇清洗所得沈澱，溶於水中並凍乾。隨後，藉由^{1}H-NMR檢測該等回收樣品之純度。

肝素前體之純化法

在醱酵結束時，於振盪瓶或7 L醱酵槽中，由培養物在12,000×*g*下離心30 min回收肝素前體。添加冰乙酸調整所得上清液至pH 4，且隨後經由具有燒結玻璃盤(孔徑40至60 μm)之Pyrex布氏漏斗過濾。將DEAE-瓊脂糖快速流動樹脂填充入適當尺寸之管柱(<20 mg肝素前體/mL膨脹樹脂)

中。首先，用含於pH 4之20 mM乙酸鈉緩衝液中之50 mM氯化鈉平衡該管柱。隨後，將該醱酵上清液轉載入該管柱，且用3倍體積之含於pH 4之20 mM乙酸鈉緩衝液中之50 mM氯化鈉清洗該管柱。隨後，用含於pH 4之20 mM乙酸鈉緩衝液中之1 M氯化鈉，自該管柱洗脫肝素前體。藉由添加3倍體積之乙醇並在-20℃下(於防爆冰櫃中)儲存此溶液過夜，使自該管柱洗脫之肝素前體沈澱。在12,000 g下離心30 min回收該沈澱。用75%乙醇清洗該集結塊，再次離心並將所獲得之集結塊凍乾用於儲存，或直接用於漂白步驟。亦可藉由添加0.02% SDS，接著激烈攪拌、離心及DEAE層析，自該細胞集結塊中純化肝素前體。

在該漂白步驟中，首先將肝素前體依~15 g/L之濃度溶於1 M氯化鈉中。用1 M NaOH將該溶液之pH調整至9.5，並添加過氧化氫(30%)，以獲得1.5%之最終濃度。在室溫下，培養該混合物過夜；隨後添加3倍體積之乙醇，在-20°C下(於防爆冰櫃中)靜置過夜，而使肝素前體沉澱。用75%乙醇清洗所得集結塊，將其溶於水中並乾燥。

肝素前體之雙醣分析

將肝素前體(10 mg/mL)溶於pH 7之200 mM磷酸鈉緩衝液中，並用各1 mU肝素裂解酶1、2及3，於30℃下處理過夜。使所得之雙醣產物在Agilent離子阱儀器上進行高效液相層析(HPLC)-電噴霧電離(ESI)-質譜(MS)，並測定該雙醣組成。在LC-MS系統(LC/MSD阱MS；Agilent, Santa Clara, CA)上，進行LC-MS分析。用於高壓液相層析之溶液A及B

分別係含有相同濃度之37.5 mM NH_4HCO_3與11.25 mM三丁胺之15%及65%乙腈。在C-18管柱(Agilent)上，使用溶液A持續20分鐘，接著為20至45 min之線性梯度0至50%溶液B，進行分離。該管柱流出液進入電噴霧電離質譜(ESI-MS)之源頭，用於藉由MS之繼續檢測。將電噴霧介面設置成具有400 V之截取電勢，240.0 V之毛細管出口，及325℃之源頭溫度之負電離模式，在全掃描光譜(150至1,500 Da，10次全掃描/秒)中獲得最大的離子豐度。使用氮氣作為乾燥(5公升/min)及霧化氣體(20 psi)。Bhattacharyya S, *Am J Respir Cell and Molec Biol* 42, 51-61。

肝素前體之NMR分析

在Bruker 600 MHz NMR光譜儀上進行^{1}H-NMR及^{13}C-NMR。以2 mg/mL之濃度於D_2O(99.99+原子%)中製備肝素前體樣品，並凍乾，以移除可交換之質子並再溶於D_2O中，並轉移至標準5 mm NMR管。使用TOPSPIN 2.0軟體讀取光譜。在298K之溫度下，獲取全部光譜。

DNA及蛋白質含量檢測

藉由測量0.1 mg/mL肝素前體溶液在260 nm及320 nm處之UV吸光度來測定該最終肝素前體產物中之DNA含量。該DNA濃度計算法為濃度(μg/mL)=(A_{260}讀數-A_{320}讀數)×稀釋倍數×50 μg/mL。使用微BCA蛋白質檢測套組，根據製造商之說明，檢測蛋白質含量。

分析肝素前體之分子量

藉由使用Mini Prep Cell (Biorad, Hercules, CA)裝置之連

續製備型聚丙烯醯胺電泳，自漂白K5肝素前體多醣製備已知分子量之肝素前體標準物之梯度(Ly等人，2010)。藉由傅立葉轉換-質譜(FT-MS)分析肝素前體部分之特徵，並再混合，以製備用於測定肝素前體之分子量性質之分子量標準物之梯度(Ly等人，2010)。使用透明質烷(HA)(其亦係具有與N-乙醯基透明質烷相同之電荷密度之線性多醣)之分子標記物作為樣品上限範圍之標準物。

HA及肝素前體分子標記均係用作於不同培養基中，在不同醱酵時間點製備之肝素前體之分子量分析之一組標準物。在肝素前體分子量分析中，使用尺寸為0.75 mm×6.8 cm×8.6 cm之梯度聚丙烯醯胺凝膠(4-15%)。將肝素前體樣品(25 μg)裝載在凝膠上，且隨後使其接受電泳(200 V持續20 min)，及用阿利辛(Alcian)藍染色1 h，且隨後用25%乙醇/10%乙酸脫色(Ly等人，2010)。掃描該等凝膠，並使用電腦軟體UN-SCANIT分析該等數位影像。獲得以遷移距離為函數之影像密度之曲線。自此等資料中，自所獲得之標準物曲線中，分析該等肝素前體樣品之分子量性質特徵。

結果

大腸桿菌K5於振盪瓶中醱酵製備肝素前體

使大腸桿菌K5於振盪瓶中生長，直至達到穩定階段1至4 h後。在穩定階段之後，繼續醱酵，以在培養基中累積最大量之肝素前體，與Manzoni M等人(1993) *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 8(3):251-257中所指出「培養基中出現之肝素前體會減緩細胞生長」之報告相

符。來自該振盪瓶培養物中之肝素前體產率在70至500 mg/L之範圍內。在所有情況下，自該振盪瓶培養物中回收之肝素前體之純度經過NMR測定為>85%(Wang Z等人(2009) Anal Biochem. 398(2):275-7)。Zhang ZQ等人(2008)「Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors」*Journal of the American Chemical Society* 130(39):12998-13007。自合成培養基(包括M9培養基、葡萄糖培養基及甘油培養基)回收之肝素前體顯示比自LB培養基回收之肝素前體(其在NMR中顯示額外的峰，與~85%純度相符(圖2))更高的純度水準(>95%)。藉由聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)進一步分析LB培養基衍生之肝素前體，顯示一條低M_w帶，其相當於與肝素前體共同純化之培養基組分。可使用3K分子量截斷值(MWCO)旋轉管柱移除此雜質(圖2A)。

在用肝素裂解酶1、2及3完全消化後，藉由HPLC-MS(未顯示)來測定肝素前體之雙醣組成，且顯示存在單一雙醣m/z 378.2。此雙醣相當於ΔUA(1→4)-α-D-GlcNAc，與肝素前體之均勻重複結構→4)-β-D-GlcA(1→4)-α-D-GlcNAc(1→相符。爲了證實此結構，在含有均勻標記之^{13}C-葡萄糖及^{15}N-氯化銨之M9培養基中培養大腸桿菌K5，來製備標記^{13}C及^{15}N之肝素前體。藉由用肝素裂解酶1、2及3完全消化，接著進行HPLC-MS，證實所回收之均勻標記之^{13}C-、^{15}N-肝素前體之結構，其顯示單一的雙醣m/z 392.9。m/z 378.2與392.9之間的15 amu差異與肝素前體含

高量完全標記^{13}C及^{15}N同位素相符，且證實該肝素前體之重複結構。

大腸桿菌K5於7L醱酵槽中之醱酵

該進料速率係呈指數增加，以跟上大腸桿菌之指數生長。在補料階段中，進行數次暫停，以確保該培養基中無葡萄糖堆積(其可造成乙酸鹽累積並抑制大腸桿菌生長)。僅在觀測到溶氧之增加(其證實葡萄糖耗盡)後，重新開始進料(圖3)。在醱酵後期(22 h後)，溶氧變為限制。使用增加攪拌並引入純氧，以使培養物中之溶氧濃度最大。31 h之後，儘管此等努力，但是溶氧濃度仍相當低。當氧氣變成限制的營養素時，葡萄糖進料速率下降。整個醱酵中，藉由添加NH_4OH使pH保持在6與8之間。醱酵37.5 h之後，達到85 g DCW/L之細胞密度，且測定該醱酵上清液中之肝素前體濃度為15 g/L。計算整體生長速率為0.12 h^{-1}，整體生產速率為1.2 g/h，且體積生產速率為0.4 g/L.h。自^{1}H-NMR光譜(圖4A)判斷，自該上清液純化之肝素前體具有高純度。此外，DNA及BCA蛋白質檢測指示，仍有<1% DNA及<2%蛋白質存在於最終肝素前體材料中。

肝素前體之結構特徵分析

^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、HPLC-MS及傅立葉轉換(FT)-MS(圖4)全部證實肝素前體之一般結構為→4)-β-D-GlcA(1→4)-α-D-GlcNAc(1→(圖1A)。圖4C中，顯示聚合度(dp)為24之肝素前體部份(使用製備型電泳獲得)之FT-MS。此光譜亦指示在某些該多醣鏈之非還原性末端存在不飽和之

糖醛酸根ΔUA殘基(圖1B)。末端殘基ΔUA之存在係與亦存在於大腸桿菌菌株K5中之K5肝素前體裂解酶之作用一致。FT-MS分析顯示自醱酵上清液回收之肝素前體含有經ΔUA殘基與經GlcA殘基封端之肝素前體之混合物。此結果係與培養基中某些藉由剪切力自細胞表面脫落及某些藉由肝素前體裂解酶消化釋放進入培養基之肝素前體相符。用β-葡糖醛酸酶(一種能自肝素前體鏈之非還原性末端移除GlcA但非DUA之外切酶)處理自該上清液單離之肝素前體。使用薄層層析(資料未顯示)觀測釋放之GlcA，證實某些脫落進入該上清液之肝素前體鏈係經GlcA封端。

肝素前體之MW特徵分析

藉由PAGE分析自振盪瓶中所生長之大腸桿菌K5回收之肝素前體，與純化肝素前體標準物之梯度比對(圖5及表1)。自M9培養基、甘油合成培養基、LB複合培養基上生長之振盪瓶培養物中之上清液回收之肝素前體顯示M_n或M_w中有少量差異。自葡萄糖合成培養基之上清液回收之肝素前體具有最低的M_n及M_w。自該集結塊回收之肝素前體顯示比自該醱酵上清液回收之肝素前體更高的M_w(資料未顯示)。

其次，在整個醱酵過程中之不同時間採集該醱酵槽之樣品，並藉由Vivapure D Mini H旋轉管柱純化肝素前體。藉由^{1}H-NMR證實自醱酵上清液得到之樣品純度為>85%。PAGE分析(圖5B)顯示肝素前體分子量開始時增加，隨著醱酵時間增加，分子量並無進一步變化(圖6)。整個醱酵過

程中，肝素前體之多分散性指數($PDI=M_w/M_n$)幾乎無變化。

討論

在此研究中，在含葡萄糖之限定培養基上生長之分批補料醱酵槽培養物中，自醱酵上清液中獲得高產率之肝素前體(15 g/L)。其比最近報導自含甘油之限定培養基上生長之相同生物體的10.2 g/L肝素前體之產率(美國專利申請公開案第2008/0032349號)有利。相較於此先前報導，體積生產率亦增加。此外，葡萄糖為比甘油便宜之碳源，使此醱酵過程更經濟。以3-L規模開發之分批補料醱酵過程可作為較大實驗室規模醱酵之原型，最終達成工業生產肝素前體。在本實驗室中，目前正進行自3 L增至750 L操作體積之製程擴大研究，其將提供大規模(100公噸)肝素前體生產以供作生物工程肝素合成之起始原料所需擴大至~100,000 L操作體積之基礎。正進行研究在醱酵中使用更快速之葡萄糖進料速率及在醱酵槽中使用更高氧氣濃度之可能性，以增加肝素前體之生產率。

使用含葡萄糖作為碳源之限定培養基可同時降低醱酵成本及減少培養基之複雜度，使純化過程較容易。自複合LB培養基純化之肝素前體因為複雜的培養基組分及需要額外純化步驟，因此純度低於自含葡萄糖之限定培養基純化之肝素前體。

自該培養物上清液單離之肝素前體可能經由K5裂解酶及剪切力之共同作用，在醱酵期間脫落進入培養基中。脫落

進入培養基之肝素前體增加時，即提高上清液中肝素前體之產率，降低下游純化過程之成本。

K5裂解酶之存在有助於肝素前體莢膜依需要釋放進入培養基中，其增加肝素前體之產率。同時，K5肝素前體裂解酶之存在造成在該鏈之非還原性末端之非天然糖殘基ΔUA，其可能需要後續處理。K5肝素前體裂解酶亦增加肝素前體之多分散性指數，其會使後續加工成肝素變複雜。生物工程之肝素之分子量性質與肝素前體密不可分。本發明方法製備具有適於加工成肝素之性質之肝素前體。因此，本發明者已顯示，當存在該裂解酶時，仍可藉由謹慎控制醱酵條件及醱酵處理時間來製備具有所需分子量性質之肝素前體。

K5裂解酶活性之未來控制可提供一種精細控制肝素前體對照物之方法。

表1自2.8 L振盪瓶中之不同培養基回收之肝素前體之數量平均分子量(M_N)、重量平均分子量(M_W)及多分散性指數(PDI)。

培養基	M_N	M_W	PDI
M9	54,000	82,000	1.5
甘油	50,000	79,000	1.6
葡萄糖	25,000	44,000	1.8
LB	54,000	68,000	1.3

實例2：20 L醱酵報告(pH固定之分批補料醱酵)

培養基

葡萄糖限定之培養基：(每公升)20 g葡萄糖、20 mg硫胺素、13.5 g KH_2PO_4、4.0 g$(NH_4)_2HPO_4$、1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1.7 g檸檬酸、及10.0 mL微量金屬溶液。微量金屬溶液由(每公升5 M HCl) 10.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成。用於該分批補料階段之進料溶液由(每公升)：700 g葡萄糖、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、47 g KH_2PO_4及0.4 g硫胺素組成。如下製備R培養基(其係用於所進行之醱酵的含葡萄糖之培養基)：

R培養基A部份：在磁力攪拌下，將$(NH_4)_2HPO_4$、KH_2PO_4、及檸檬酸添加至約8公升水中，添加微量金屬溶液(100X倍原液)，將pH調整至6.80，隨後，添加水至9公升。將A部份於醱酵槽中，在121℃下，滅菌45分鐘。

R培養基B部份：將$MgSO_4$及葡萄糖溶液分別製成10X原液，並用高壓釜在110℃下，分別滅菌20分鐘(亦可經過濾器滅菌)。

進料溶液：在加熱及攪拌下，將葡萄糖、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$及47 g KH_2PO_4溶於1公升水中，並藉由高壓釜在115℃下，滅菌20分鐘。將硫胺素溶於水中，且隨後經過濾器滅菌。

操作步驟

第1天：上午，用K5大腸桿菌菌株(儲存於-80℃冷凍庫中)接種在含如上所述葡萄糖合成培養基(R培養基)之四支5 ml培養管中，在37℃之培養箱中，以220 rpm振盪生長10

小時。晚上，將四個培養物轉移至於2.8 L有折流板振盪瓶中之500 ml培養基中，並在37℃下，以220 rpm振盪生長10小時。

第2天：將醱酵槽pH探針及DO探針滅菌，並在生長溫度(37℃)下校準。設置三個泵：泵1-用於pH調整之NH_4OH；泵2-進料溶液；泵3-消泡劑。

將R培養基B部份添加至該醱酵槽中，以與A部份混合，並接種500 ml種子培養物。藉由泵入NH_4OH使pH保持在6.8。當觀測到pH尖峰及DO尖峰時，開始泵入進料溶液。設定該進料泵，使其在pH>6.8時提供100%輸出(脈衝輸出~6.7 g葡萄糖)。提高攪拌速度及/或空氣流速，保持DO在20%以上。當無法藉由改變攪拌速度或空氣流動使DO保持在20%以上時，即添加純氧流。

第3天：當該培養物之OD^{600}值開始下降時，即停止醱酵。收穫該培養物並離心。自該上清液回收肝素前體。

圖7中之藍色曲線係DO(該培養物中之溶氧)趨勢。因為高密度之細胞消耗氧氣非常快速，所以在收穫前幾小時DO變成接近0，同時仍保持純氧流。當OD^{600}(該培養物在600 nm光波長處之光密度)開始下降後的幾小時後，停止醱酵。藉由關閉氧氣流、停止攪拌，使醱酵停止，且隨後開始收穫。

取樣：取約40 ml以測量在600 nm處之光密度，隨後在12,000×g下離心30 min，以自大腸桿菌細胞分離上清液。分別將上清液及細胞集結塊冷凍。

醱酵樣品分析：在天秤上稱重乾燥細胞集結塊，測量乾燥細胞重(DCW)。在經過乙醇沈澱之後，藉由NMR定量法或咔唑檢測法測量上清液中之肝素前體濃度。Song J-M等人(2009)「A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth」*Carbohydrate Polymers* 78 (2009) 633-634。Wang Z等人(2009) Anal Biochem. 398(2):275-7。

該等結果係示於圖7、8及9中。

在此醱酵階段中製備之肝素前體之數量平均分子量為約58,000 Da、重量平均分子量為約84,000 Da、及多分散性指數(PDI)為約1.4。預估純度在95%或以上。

實例3：使用殼聚糖層析法之肝素前體純化

殼聚糖係一種由隨機分佈之β-(1-4)-連接的D-葡糖胺及N-乙醯基-D-葡糖胺組成之線性多醣，其作為陰離子交換樹脂之交換物質，用於層析純化肝素前體。殼聚糖中之胺基(~pKa 6.5)使其在酸性條件下帶正電且可溶，及因此適於基於親和力之帶負電之肝素前體之純化法。很容易基於殼聚糖濃度及初始pH控制基於殼聚糖之肝素前體之純化。此外，殼聚糖價格便宜，供應量充足且可經生物降解。此實例描述一種基於可溶性殼聚糖，用於直接自醱酵液有效回收肝素前體之分離方法。這種以電價中和作用為基礎，使用殼聚糖進行之分離法有潛力用於自複合醱酵混合物中純化其他帶負電荷之大分子。

在7000 rpm下，將來自7 L大腸桿菌K5醱酵之醱酵液離心30 min，以移除該等細胞。

1. 以基於NMR之定量法測定該上清液中之肝素前體含量。
2. 使用HCl溶液將該上清液之pH調整至4.0，接著在7000 rpm下離心1 h，以移除任何沈澱出來之雜質。
3. 接著，使用pH 4.0之DI水將此上清液稀釋5倍。
4. 藉由將殼聚糖溶於1%乙酸溶液中，製備10 mg/ml殼聚糖溶液。使用該10 mg/ml殼聚糖溶液，依每10 mg肝素前體添加2.5 mg殼聚糖至該上清液。
5. 隨後在室溫下，攪拌該混合物10 min，以確保所得溶液之充分混合。接著，在4℃下，培養該混合物過夜。
6. 殼聚糖-肝素前體聚合電解質複合體形成沉澱而沉降下來，並在8000 rpm下離心1 h來回收。
7. 接著，用pH 4.0之DI水清洗該沈澱，並在8000 rpm下再離心1 h。
8. 在鹼性條件下，殼聚糖失去其陽離子特性，其造成靜電複合體瓦解，造成溶液中之游離肝素前體及不溶性殼聚糖。將洗淨之集結塊置於1 M NaOH溶液中且培養過夜，以回收溶液中之肝素前體。經由過濾或在10000 rpm下離心2 h移除不溶性殼聚糖。此步驟可再加上陽離子交換步驟或陰離子交換步驟，來移除其他製程雜質，其造成進一步純化所回收之肝素前體。

實例3A

使用上述程序，使用呈管柱模式之DEAE瓊脂糖快速流動樹脂，純化醱酵液中之肝素前體，接著用四倍體積之乙醇沈澱。隨後，使用3500 MWCO薄膜相對DI水透析所回收之肝素前體。隨後，使用旋轉蒸發儀，在體積減少後，將透析溶液冷凍乾燥。

隨後，將其溶於pH 4.0去離子水，製備此純化肝素前體之1 mg/ml溶液。使用10 ml之該1 mg/ml溶液，及使用含於1%乙酸中之10 mg/ml殼聚糖溶液添加2至6 mg範圍內之不同量殼聚糖，製備六種不同樣品。在4°C下，培養該等樣品過夜。藉由在8000 rpm下離心該等樣品1 h，回收沈澱之聚合電解質複合體。隨後，將1 M NaOH溶液添加至未用pH 4.0之DI水清洗之所得集結塊。在10000 rpm下離心2 h，移除不溶性殼聚糖。隨後，使用咔唑檢測法分析回收之樣品及上清液中存在之肝素前體。

根據咔唑檢測法，在pH 4.0下，添加4 mg殼聚糖至10 ml之1 mg/ml肝素前體溶液中，可達到肝素前體之100%回收。

實例3B

在其他實驗中，添加鹽酸至pH 4.0，來調整醱酵後離心後所獲得之上清液。接著，在8000 rpm下離心1 h，以移除沈澱出來之雜質。隨後，使用1 M NaOH溶液，將該上清液調整回至pH 4.0。此調整過pH之樣品之NMR定量法顯示該等樣品中無肝素前體之損失。

隨後，使用pH 4.0 DI水，將該等樣品稀釋五倍。接著，

使用含於1%乙酸中之10 mg/ml殼聚糖溶液，在每份樣品中添加2至8 mg範圍內之殼聚糖，製成六種樣品各10 ml。在4°C下，培養該等樣品過夜。在8000 rpm下離心該等樣品1 h，回收沈澱之聚合電解質複合體。隨後，將1 M NaOH溶液添加至未用pH 4.0之DI水清洗之所得集結塊。在10000 rpm下離心2 h，移除不溶性殼聚糖。隨後，使用咔唑檢測法分析所回收樣品及上清液中存在之肝素前體。該等樣品之咔唑檢測法顯示，來自該醱酵液之肝素前體純化~70%。

本發明提供一種用於自醱酵液回收肝素前體之有效純化方法。在此方法中使用之殼聚糖便宜、容易獲得、具生物相容、且生物可降解。此等性質使其用作純化肝素前體之理想沈澱劑，且可經酶修飾為可經靜脈遞送之肝素。本發明亦提供一種重要的濃縮步驟，藉此比常用之乙醇沈澱步驟更減少此方法需要之操作體積。例如，在某些情況下，乙醇沈澱之操作體積會超過醱酵體積。殼聚糖之生物相容及生物可降解性質使其比其他具天然毒性之聚陽離子(如，氯化十六烷基吡啶(CPC)及聚(二烯丙基二甲基氯化銨))更有利。此外，此方法具有純化其他此等多醣類(如透明質酸及酸性蛋白質、及DNA)之潛力。

本發明亦提供一種使用沈澱法自醱酵液回收細菌莢膜多醣(K5肝素前體)之有效成本回收法，具有用於發展生物工程肝素之潛力。本發明使用自然衍生之生物相容且生物可降解之聚陽離子，藉此提供一種用於可經靜脈遞送藥物

(如肝素)之有效及安全的純化技術。經由此方法獲得之高產率，使其作為理想的濃縮步驟，藉此減少操作體積。此步驟之容易回收及其與生物工程肝素之化學酶合成法中其他步驟之相容性使其用作理想的純化方法。此方法具有移除源自細菌醱酵之其他陰離子多醣類及蛋白質、及高度帶負電種類(如DNA)之潛力。

【圖式簡單說明】

圖1 肝素前體之結構。A. 肝素前體之重複雙醣單元；B. 由肝素前體K5裂解酶之作用造成之肝素前體鏈之結構。

圖2 於振盪瓶培養物中製備之肝素前體之^{1}H-NMR光譜(600 MHz)。A.自以下培養基回收之肝素前體之堆積曲線：1. LB培養基；2. $MW_{平均}$>3,000之LB培養基；3. $MW_{平均}$<3,000之LB培養基，且插圖顯示樣品1、2及3之PAGE分析。B.自M9培養基回收之肝素前體。C.係甘油限定之培養基回收之肝素前體。D.自葡萄糖限定之培養基回收之肝素前體。

圖3 於7 L醱酵槽中生產肝素前體。A板顯示以醱酵時間(h)為函數之葡萄糖饋入曲線(黑色)、pH曲線(藍色)及溶氧(%DO)曲線(紅色)。B板顯示以醱酵時間(h)為函數之細胞生長曲線(總DCW g，▲)及肝素前體產量(g，■)。

圖4 自7 L醱酵之上清液純化之肝素前體之特徵分析。A.肝素前體之^{1}H-NMR(600 MHz)。B.在含^{13}C葡萄糖及^{15}N硫酸銨之M9培養基上製備之肝素前體之^{13}C-NMR。C.藉由

製備型PAGE(Ly等人，2010)純化之平均分子量為4551.81(聚合度=24)之肝素前體鏈之FT-MS。

圖5 用於經阿利辛藍(Alcian blue)染色之肝素前體之MW分析的PAGE。A.跨梯度凝膠範圍之分子標準物。泳道含有：1.HA分子標記(30 kD至310 kD)；2.肝素前體分子標記(6.4 kD至14.1 kD)。B.在振盪瓶中於不同培養基製備之肝素前體。泳道含有：1.來自M9培養基之肝素前體；2.來自甘油合成培養基之肝素前體；3.來自葡萄糖合成培養基之肝素前體；及4.來自LB培養基之肝素前體。C.於7 L醱酵槽中，在不同時間取樣已製得之肝素前體。泳道含有：1至6.在醱酵開始之後的4.5 h；12.6 h；14.5 h；20 h；32.9 h；及37.6 h時，自該醱酵槽取樣之肝素前體。

圖6 於7 L醱酵槽中生產之肝素前體之分子量性質之時間過程。顯示的係M_N(■)、M_W(●)及PDI(◆)之趨勢。

圖7 於20 L醱酵槽中，以醱酵時間(h)為函數之pH曲線(■)及溶氧(% DO)曲線(♦)。

圖8 於20 L醱酵槽中，細胞生長曲線(DCW g/L，(■))及醱酵上清液中之肝素前體濃度(g/L，(♦))之時間過程。

圖9 經純化之肝素前體樣品之^{1}H-NMR光譜。

圖10 自10 ml之1 mg/ml純肝素前體溶液，使用不同量之殼聚糖之沈澱後，上清液中之肝素前體濃度。

圖11 自10 ml之1 mg/ml純肝素前體溶液，使用不同量之殼聚糖之回收百分比。

圖12 自10 ml之5x稀釋之醱酵液樣品，使用不同量之殼聚糖之回收百分比。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99129401

C12P 19/04 (2006.01)

※申請日：99.8.31

※IPC 分類：~~C12P;~~ C08B 37/10 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

K5肝素前體(HEPAROSAN)之醱酵及純化

K5 HEPAROSAN FERMENTATION AND PURIFICATION

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種適於工業生產自大腸桿菌K5之醱酵培養物製備肝素前體(heparosan)之方法，其顯示優越的產率及純度、較小的培養體積、更快的生長、及較低的成本。

三、英文發明摘要：

A method for the production of heparosan from fermentation culture of E. coli K5 suitable for industrial production, exhibiting superior yield and purity, smaller culture volumes, faster growth, and lower costs.

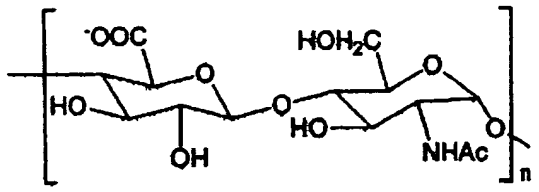
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 8 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

（無元件符號說明）

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

A 

七、申請專利範圍：

1. 一種自大腸桿菌(*E.coli*)K5製備實質上純肝素前體(heparosan)之方法，其包含：

(a)大腸桿菌K5於葡萄糖作為主要碳源之限定培養基中培養，其中該培養係由批次生長階段及批次補料生長階段組成，其中

(i)用於該批次生長階段之培養基包含(每公升)約20 g葡萄糖、10至300 mg硫胺素、約13.5 g KH_2PO_4、約4.0 g $(NH_4)_2HPO_4$、約1.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、約1.7 g檸檬酸、及約10.0 mL微量金屬溶液；其中該微量金屬溶液基本上由(每公升5 M HCl)10.0g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、2.0 g $CaCl_2$、2.2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$、1.0 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、0.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、及0.02 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$組成，及其中；

(ii)用於該批次補料生長階段之進料培養基係由(每公升)250至1000 g葡萄糖、20 g $MgSO_4$、0.15-0.5 g硫胺素及含或不含47 g KH_2PO_4組成，及

(iii)其中藉由補充或未補充氧氣之噴佈空氣(sparged air)提供氧氣；

(b)將肝素前體結合至固相，隨後洗脫；及

(c)自該洗脫液沈澱肝素前體；

其中該實質上純肝素前體之純度至少90%。

2. 如請求項1之方法，其中溶氧係保持在約20%。

3. 如請求項1之方法，其中該溫度係保持在約37℃，該pH

係保持在約7。

4. 如請求項3之方法，其中藉由添加29%氨溶液保持該pH。

5. 如請求項1之方法，其中用於該分批補料階段之培養基係以如下決定之速率饋入：

$$Ms(t)=F(t)\,S_{F(t)}=\left(\frac{\mu}{Y_{\frac{x}{s}}}+m\right)X(t_0)V(t_0)\exp\left[\mu(t-t_0)\right]$$

其中Ms係碳源之質量流速(g/h)；F係進料流速(L/h)；S_F係進料中之碳受質濃度(g/L)；X係細胞濃度(g/L dcw)；m係比維持係數(g/g dcw/h)；V係培養體積(L)；t_0係饋入開始時間；t係處理時間；μ係比生長率 (h^{-1})；及$Y_{x/s}$係碳受質上之細胞產率(g/g)。

6. 如請求項1之方法，其中每公升培養上清液獲得超過12 g肝素前體。

7. 如請求項6之方法，其中該醱酵係少於48小時，不包括菌元(starter)培養。

8. 如請求項1之方法，其中該結合及洗脫步驟包含(i)移除細胞；(ii)將陰離子交換樹脂與該培養上清液混合並移除該上清液；(iii)用含於pH 4之乙酸鈉緩衝液中之50 mM氯化鈉洗該樹脂；(iv)用含於pH 4之乙酸鈉緩衝液中之1 M氯化鈉洗脫。

9. 如請求項1之方法，其中該結合及洗脫步驟包含(i)移除細胞；(ii)將殼聚糖溶液與該培養上清液混合；(iii)使該

殼聚糖沈澱並單離該沈澱；(iv)洗該殼聚糖；(v)用約1 M NaOH洗脫肝素前體。

10. 如請求項1之方法，其中使該肝素前體自洗脫液沈澱係包含乙醇沈澱。

11. 如請求項1之方法，其另外包含用過氧化氫除熱原。

12. 如請求項1之方法，其中該肝素前體係低於1% DNA及低於2%蛋白質。

13. 如請求項1之方法，其中該肝素前體具有約58,000 Da之數量平均分子量、約84,000 Da之重量平均分子量、及約1.4之多分散性指數(PDI)。

14. 如請求項1之方法，其中該肝素前體係至少95%純度。

15. 一種藉由如請求項1至14中任一項之方法製備之肝素前體。

16. 一種自如請求項15之肝素前體製造之肝素。

17. 一種藉由如請求項1至14中任一項之方法製得之肝素前體之用途。