



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102369276 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 04

(21) 申请号 201080008868. 6

(22) 申请日 2010. 02. 18

(30) 优先权数据

61/154, 204 2009. 02. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/024626 2010. 02. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/096588 EN 2010. 08. 26

(73) 专利权人 文特里亚生物科学公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 S · C · 珀蒂

M · A · 费尔南德斯 - 桑托斯 N · 黄

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006. 01)

C07K 14/76 (2006. 01)

C07K 14/79 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6733746 B2, 2004. 05. 11, 第 4 栏第 19 行

至第 7 栏第 45 行, 权利要求 1-58.

Ying Q. L., et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. 《Nature》. 2008, 第 453 卷第 519 页最后一段至第 520 页第 1 段, METHODS 部分.

无. Cellastim™

Recombinant Human Serum Albumin.

《InVitria Industry Yearbook》. 2008, 第 20 页.

Ravagnan L., et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. 《Nature Cell Biology》. 2001, 第 3 卷第 839-843 页.

审查员 李子东

(54) 发明名称

含有蛋白质组合的细胞培养基

(57) 摘要

本发明涉及含有蛋白组合的细胞培养基, 以及制造所述细胞培养基的方法, 和利用所述细胞培养基改善所培养细胞的生长特性的方法。

权利要求书2页 说明书79页
序列表3页 附图19页

1. 一种用于促进培养细胞生长的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物,其中所述转铁蛋白相关蛋白选自乳铁蛋白和转铁蛋白,且所述重组白蛋白为

- i) 在植物中产生,
- ii) 具有少于 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和
- iii) 少于 2%的聚集白蛋白 ;

并且其中所述补充物包含的所述转铁蛋白与所述重组白蛋白的所述比例 (wt/wt) 为 1 比 50 至 1 比 200,或者其中所述补充物包含的所述乳铁蛋白与所述重组白蛋白的所述比例 (wt/wt) 为 1 比 3 至 1 比 0.33。

2. 一种用于提高从培养细胞产生的产物的产量的方法,其包含将补充物加入所述培养物,其中所述补充物包含重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物,其中所述转铁蛋白相关蛋白选自乳铁蛋白和转铁蛋白 ;其中所述重组白蛋白为

- i) 在植物中产生,
- ii) 具有少于 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和
- iii) 少于 2%的聚集白蛋白 ;

并且其中所述补充物包含的所述转铁蛋白与所述重组白蛋白的所述比例 (wt/wt) 为 1 比 50 至 1 比 200,或者其中所述补充物包含的所述乳铁蛋白与所述重组白蛋白的所述比例 (wt/wt) 为 1 比 3 至 1 比 0.33。

3. 一种用于提高生物反应器中所培养的细胞的活力的方法,其包含将补充物加入所述生物反应器中的所述培养物,其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物,其中所述转铁蛋白相关蛋白选自乳铁蛋白和转铁蛋白 ;其中所述重组白蛋白为

- i) 在植物中产生,
- ii) 具有少于 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和
- iii) 少于 2%的聚集白蛋白 ;

并且其中所述补充物包含的所述转铁蛋白与所述重组白蛋白的所述比例 (wt/wt) 为 1 比 50 至 1 比 200,或者其中所述补充物包含的所述乳铁蛋白与所述重组白蛋白的所述比例 (wt/wt) 为 1 比 3 至 1 比 0.33。

4. 权利要求 2 所述的方法,其中所述培养细胞的活力增加。

5. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述补充物还包含胰岛素。

6. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述补充物还包含硒和乙醇胺。

7. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述细胞为组织培养细胞。

8. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述细胞为 CHO 细胞。

9. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述细胞为杂交瘤细胞。

10. 权利要求 2 所述的方法,其中所述产物为抗体。

11. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中所述重组白蛋白包含至少 0.01% wt/wt 的热休克蛋白。

12. 权利要求 11 所述的方法,其中所述热休克蛋白为水稻热休克蛋白。

13. 权利要求 11 所述的方法,其中所述热休克蛋白选自水稻 HSP70 基因和水稻胚乳管腔结合蛋白。

-
14. 权利要求 11 所述的方法,其中所述热休克蛋白选自 SEQ ID No. 5、EEC69073/OsI_37938 和 AAB63469。
 15. 权利要求 11 所述的方法,其中所述乳铁蛋白为重组乳铁蛋白。

含有蛋白质组合的细胞培养基

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 2 月 20 日提交的美国临时专利申请第 61,154,204 号的权益,其全部内容援引并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及含有蛋白组合的细胞培养基,以及制造所述细胞培养基的方法,和利用所述细胞培养基改善所培养细胞的生长特性的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 细胞培养技术允许从组织取出的动物或植物细胞在供应适当的营养和条件时生长。细胞能够分裂并且可以继续生长直至被诸如营养消耗或毒性积累的培养变量所限制 (Butler, M. & Jenkins, H., "Nutritional aspects of growth of animal cells in culture," J of Biotechnol. (1989)12 :97-110)。细胞培养技术具有许多应用,包括细胞的正常生理学或生物化学的研究 (Balaban, B. & Urman, B., "Embryo culture as a diagnostic tool," Reprod. Biomed. Online (2003)7 (6) :671-82), 测试各种化合物或药物对特定细胞类型的影响 (Farkas, D. & Tannenbaum, S. R., "In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity :a literature review," Curr. Drug Metab. (2005)6 (2) :111-25), 研究各种细胞类型的顺序或并行组合以产生人工组织 (Wang et al., "Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes," Biomaterials (2006)), 以及从大规模细胞培养合成有价值的生物制品 (Zeilinger et al., "Three-dimensional co-culture of primary human liver cells in bioreactors for in vitro drug studies :effects of the initial cell quality on the long-term maintenance of hepatocyte-specific functions," Altern. Lab Anim. (2002)30 (5) :525-38)。细胞培养技术还用于体外受精 (Blake et al., "Protein supplementation of human IVF culture media," J Assist. Reprod. Genet. (2002)19 (3) :137-43 ;Bungum et al., "Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF : a prospective randomized study," Reprod. Biomed. Online (2002)4 (3) :233-6), 干细胞研究 (Conley et al., "Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells," Int. J Biochem. Cell Biol. (2004)36 (4) :555-67), 疫苗生产 (Chuang et al., "Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human albumin," Pharm. Res. (2002)19 (5) :569-77 ;GlaxoSmithKline, HAVRIX [®] (Hepatitis A Vaccine, Inactivated)-Prescribing Information (2005), 可获自 http://us.gsk.com/products/assets/us_havrix.pdf ;Innis et al., "Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine," JAMA (1994)271 (17) :1328-34 ;Merck, PROQUAD [®] -Measles, Mumps, Rubella, and Varicella (Oka/Merck) Virus Vaccine Live-Prescribing Information (2005), 可获自 http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/p/

proquad/proquad_pi.pdf;Litwin, J., "The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media," *Cytotechnology* (1992) 10 (2) :169-74), 组织工程, 包括人工皮肤 (Atala, A., "Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineering," *Urol.Clin.North Am.* (1999) 26 (1) :157-65, ix-x; Sher, et al., "Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation," *J Biol.Chem.* (2006) 281 (8) :5178-87) 和器官 (Neronov et al., "Integrity of endothelium in cryopreserved human cornea," *Cryo Letters* (2005) 26 (2) :131-6; Han, et al., "Interleukin-1 alpha-induced proteolytic activation of metalloproteinase-9 by human skin," *Surgery* (2005) 138 (5) :932-9), 以及基因和细胞治疗 (Chadd, H. E. & Chamow, S. M., "Therapeutic antibody expression technology," *Curr. Opin. Biotechnol.* (2001) 12 (2) :188-94)。

[0006] 生物制品涵盖广泛范围的细胞产品, 并且包括需要动物细胞来繁殖的特定蛋白或病毒。例如, 诸如单克隆抗体的治疗性蛋白可以通过使遗传工程细胞在大规模培养中生长来大量合成 (Dewar et al., "Industrial implementation of in vitro production of monoclonal antibodies, *Ilar J* (2005) 46 (3) :307-13)。在过去十年中这样有商业价值的生物制品的数量迅速增加, 并且引起目前对哺乳动物细胞培养技术的广泛兴趣 (Mizrahi, A., "Biologicals produced from animal cells in culture-an overview," *Biotechnol. Adv.* (1988) 6 (2) :207-20)。

[0007] 将细胞培养用于上文任何应用的主要优点是可以从使用一批克隆细胞所获得的结果的一致性和重复性。对细胞培养的需要, 尤其是大规模细胞培养, 与对病毒疫苗的需要变得明显。在 20 世纪 40 年代和 50 年代脊髓灰质炎的大流行促进了开发有效疫苗的努力。1949 年, 显示脊髓灰质炎病毒可以在人细胞的培养物中生长, 其引起对利用细胞培养发展大量脊髓灰质炎疫苗的相当大的兴趣 (Ligon, B. L., "Thomas Huckle Weller MD: Nobel Laureate and research pioneer in poliomyelitis, Varicella-zoster virus, cytomegalovirus, rubella, and other infectious diseases," *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* (2002) 13 (1) :55-63)。从灭活病毒产生的脊髓灰质炎疫苗成为最早的培养动物细胞的商业产品之一 (Furesz, J., "Developments in the production and quality control of poliovirus vaccines-Historical perspectives," *Biologicals* (2006))。

[0008] 因为与动物来源的细胞培养基组分的使用相关的安全和伦理考虑, 已作出努力为细胞培养基和培养基组分提供替代来源。

[0009] 基于 2006 年 6 月 28 日提交的美国临时申请第 60/694, 236 号的 PCT 申请公开文本 WO 2007/002762 涉及利用植物细胞的细胞培养基组分的重组生产, 以及含有这样的重组蛋白的细胞培养基。该申请的全部内容援引并入本文。

[0010] 发明概述

[0011] 因此, 本发明的目的是提供含有蛋白组分的组合的细胞培养基或培养基补充物, 当在细胞培养中使用, 其导致所培养细胞的生长和 / 或生产力提高。

[0012] 本发明的一实施方案为细胞培养基, 其包括细胞培养基基础以及选自生长因子、乳铁蛋白、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因

子、haptocorin、乳粘素 (lactahedrin)、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白和 α -乳白蛋白的两种或更多种蛋白。

[0013] 而本发明的另一实施方案为细胞培养基,其包括细胞培养基基础、白蛋白以及选自生长因子、乳铁蛋白、转铁蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白和 α -乳白蛋白的至少一种额外的蛋白。

[0014] 根据其他实施方案,在所述细胞培养基中可以提供的生长因子选自表皮生长因子、角质形成细胞生长因子、胰岛素样生长因子、肠三叶因子 (intestinal trefoil factors)、转化生长因子、粒细胞集落形成刺激因子、神经生长因子和成纤维细胞生长因子。

[0015] 本发明的另一实施方案为细胞培养基,其包括细胞培养基基础、乳铁蛋白以及选自表皮生长因子、角质形成细胞生长因子、胰岛素样生长因子、肠三叶因子、转化生长因子、粒细胞集落形成刺激因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白和 α -乳白蛋白的至少一种额外的蛋白。

[0016] 根据其他实施方案,所述细胞培养基中所含的蛋白为重组蛋白,优选为重组人蛋白。还根据其他实施方案,所述细胞培养基中的一种或多种蛋白为植物产生的异源蛋白,优选所述细胞培养基中的两种或更多种蛋白为植物产生的异源蛋白,并且更优选所述细胞培养基中的所有蛋白为植物产生的异源蛋白。

[0017] 根据其他实施方案,所述细胞培养基中可以提供的优选的蛋白组合包括乳铁蛋白和白蛋白。

[0018] 本发明的另一实施方案提供产生补充细胞培养基的方法,其包括提供细胞培养基基础;提供选自生长因子、乳铁蛋白、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白和 α -乳白蛋白的两种或更多种蛋白;以及将所述两种或更多种蛋白与细胞培养基基础组合以形成补充细胞培养基。

[0019] 根据其他实施方案,在产生细胞培养基的方法中所用的蛋白为重组蛋白,优选为重组人蛋白。还根据其他实施方案,在产生细胞培养基的方法中所用的一种或多种蛋白为植物产生的异源蛋白,优选在产生细胞培养基的方法中所用的两种或更多种蛋白为植物产生的异源蛋白,并且更优选在产生细胞培养基的方法中所用的所有蛋白为植物产生的异源蛋白。

[0020] 根据其他实施方案,在产生细胞培养基的方法中可以提供的生长因子选自表皮生长因子、角质形成细胞生长因子、胰岛素样生长因子、肠三叶因子、转化生长因子、粒细胞集落形成刺激因子、神经生长因子和成纤维细胞生长因子。

[0021] 根据其他实施方案,在产生细胞培养基的方法中可以使用的优选的蛋白组合包括乳铁蛋白和白蛋白。

[0022] 本发明的另一实施方案提供培养细胞的方法,其包括提供细胞培养基基础;向细胞培养基基础补充选自生长因子、乳铁蛋白、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白和 α -乳白蛋白的两种或更多种蛋白以形成补充细胞培养基;以及将待培养的细胞引入补充细胞培养基。与在未补充细胞培养基中生长的细胞相比,在补充细胞培养基中生长的细胞表现出改善的生长特性。

[0023] 根据其他实施方案,在培养细胞的方法中所用的蛋白为重组蛋白,优选为重组人蛋白。还根据其他实施方案,在培养细胞的方法中所用的一种或多种蛋白为植物产生的异源蛋白,优选在培养细胞的方法中所用的两种或更多种蛋白为植物产生的异源蛋白,并且更优选在培养细胞的方法中所用的所有蛋白为植物产生的异源蛋白。

[0024] 根据其他实施方案,在培养细胞的方法中可以使用的生长因子选自表皮生长因子、角质形成细胞生长因子、胰岛素样生长因子、肠三叶因子、转化生长因子、粒细胞集落形成刺激因子、神经生长因子和成纤维细胞生长因子。

[0025] 根据其他实施方案,在培养细胞的方法中可以使用的优选的蛋白组合包括乳铁蛋白和白蛋白。

[0026] 本发明的另一方面包括通过在本发明的细胞培养基中培养所培养的细胞来获得所培养细胞提高的生长速率和所培养细胞更高的生产力的方法。

[0027] 在另一实施方案中,本发明包括补充物,其包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0028] 在另一实施方案中,本发明包括补充物,其包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1,000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0029] 在任何本发明的补充物的一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.01% wt/wt 的热休克蛋白。在该实施方案的方面,所述热休克蛋白为水稻热休克蛋白。在另一方面,所述热休克蛋白选自水稻 HSP70 基因和水稻胚乳管腔结合蛋白 (endosperm lumenal binding protein)。在另一方面,热休克蛋白选自水稻 (gb|ACJ54890.1|)、EEC69073/OsI_37938 和 AAB63469。

[0030] 在任何本发明的补充物的另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.01% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.04% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.06% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.08% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.1% wt/wt 的 HSP70。

[0031] 在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白相关蛋白为乳铁蛋白。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白相关蛋白为转铁蛋白。在任何本发明的补充物的一方面,所述乳铁蛋白是人的。在任何本发明的补充物的一方面,所述转铁蛋白是人的。在任何本发明的补充物的一方面,所述乳铁蛋白是重组的。在任何本发明的补充物的一方面,

面,所述乳铁蛋白来源于血浆。在任何本发明的补充物的一方面,所述转铁蛋白是重组的。在任何本发明的补充物的一方面,所述转铁蛋白来源于血浆。在任何本发明的补充物的一方面,所述 IGF-1 是人的。在任何本发明的补充物的一方面,所述 IGF-1 是重组的。

[0032] 在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 200。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 75 至约 1 比 180。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 80 至约 1 比 120。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 1000。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 2000。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 3000。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 4000。在任何本发明的补充物的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 5000。

[0033] 在任何本发明的补充物的另一方面,所述乳铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 3 至约 1 比 0.33。在任何本发明的补充物的另一方面,所述乳铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 0.5 至约 1 比 2。在任何本发明的补充物的另一方面,所述乳铁蛋白与白蛋白的比例为 1 比 0.8 至约 1 比 1.2。

[0034] 在另一实施方案中,本发明包括用于促进培养细胞生长的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物,其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生,ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0035] 在另一实施方案中,本发明包括用于促进培养细胞生长的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物,其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生,ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0036] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高已适应无血清培养基的细胞的生产力的方法,其包含将补充物加入无血清培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生;ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0037] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高已适应无血清培养基的细胞的生产力的方法,其包含将补充物加入无血清培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生,ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0038] 在另一实施方案中,本发明包括用于减少生物反应器中乳酸积累的方法,其包含将补充物加入在生物反应器中培养的细胞;其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生,ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /

mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0039] 在另一实施方案中,本发明包括用于减少生物反应器中乳酸积累的方法,其包含将补充物加入在生物反应器中培养的细胞 ;其中所述补充物包含 :重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0040] 在另一实施方案中,本发明包括用于减少生物反应器中葡萄糖和其他糖的消耗的方法,其包含将补充物加入在生物反应器中培养的细胞 ;其中所述补充物包含 :重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0041] 在另一实施方案中,本发明包括用于减少生物反应器中葡萄糖和其他糖的消耗的方法,其包含将补充物加入在生物反应器中培养的细胞 ;其中所述补充物包含 :重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0042] 在另一实施方案中,本发明包括减少在生物反应器中从培养开始到收获所产生的蛋白所需的时间的方法,其包含将补充物加入在生物反应器中培养的细胞 ;其中所述补充物包含 :重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0043] 在另一实施方案中,本发明包括减少在生物反应器中从培养开始到收获所产生的蛋白所需的时间的方法,其包含将补充物加入在生物反应器中培养的细胞,其中所述补充物包含 :重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0044] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高生物反应器中细胞的活力的方法,其包含将补充物加入生物反应器,其中所述补充物包含 :重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0045] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高生物反应器中细胞的活力的方法,其包含将补充物加入生物反应器,其中所述补充物包含 :重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物 ;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白 ;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白 ;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0046] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高在无血清条件下生长的细胞的活力的方

法,其包含将补充物加入无血清培养基,其中所述补充物包含重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0047] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高在无血清条件下生长的细胞的活力的方法,其包含将补充物加入无血清培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0048] 在另一实施方案中,本发明包括用于在以低密度接种时提高细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0049] 在另一实施方案中,本发明包括用于在以低密度接种时提高细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0050] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高从单细胞克隆生长的细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0051] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高从单细胞克隆生长的细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0052] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高培养中生长的原代细胞的活力的方法,其包含将补充物加入培养基,其中所述补充物包含重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0053] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高培养中生长的原代细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素/mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0054] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高转染之后细胞的活力的方法,其包含在转染之前、期间或之后立即将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0055] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高转染之后细胞的活力的方法,其包含在转染之前、期间或之后立即将补充物加入细胞培养基,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0056] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高低温保存之后细胞的活力的方法,其包含在低温保存或解冻之前、期间或之后立即将补充物加入细胞培养基;其中所述补充物包含:重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。

[0057] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高低温保存之后细胞的活力的方法,其包含在低温保存或解冻之前、期间或之后立即将补充物加入细胞培养基;其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 1000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。

[0058] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高从培养细胞产生的重组产物产量的方法,其包含将补充物加入培养物,其中所述补充物包含重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 5000 至约 1 比 0.5 的转铁蛋白相关蛋白和白蛋白。在该方法的一方面,提高了细胞培养物的活力。在该方法的一方面,所述产物为蛋白或细胞相关细菌。在另一方面,所述蛋白为抗体。在一方面,所述蛋白为重组蛋白,在另一方面,所述蛋白为单体,在另一方面,所述蛋白为多聚体蛋白,在另一方面,并且所述抗体为全长。在另一方面,所述抗体为单链抗体。

[0059] 在另一实施方案中,本发明包括用于提高从培养细胞产生的重组产物产量的方法,其包含将补充物加入培养物,其中所述补充物包含:重组白蛋白和胰岛素相关生长因子的混合物;其中所述重组白蛋白为 i) 在植物中产生, ii) 具有少于约 1EU 内毒素 /mg 白蛋白;和 iii) 少于约 2% 的聚集白蛋白;并且其中所述补充物包含比例 (wt/wt) 为约 1 比 100000 至约 1 比 5000 的胰岛素相关生长因子和白蛋白。在该方法的一方面,提高了细胞培养物的活力。在该方法的一方面,所述产物为蛋白或细胞相关细菌。在另一方面,所述蛋白为抗体。在一方面,所述蛋白为重组蛋白,在另一方面,所述蛋白为单体,在另一方面,所述蛋白为多聚体蛋白,在另一方面,并且所述抗体为全长。在另一方面,所述抗体为单链抗体。

[0060] 在任何这些方法的一方面,所述补充物还包含胰岛素。在任何这些方法的一方面,所述补充物还包含 IGF-1。在另一方面,所述补充物还包含硒和乙醇胺。

[0061] 在任何本发明的方法的另一方面,所述细胞为组织培养细胞。在另一方面,所述细胞为 CHO 细胞。在另一方面,所述细胞为杂交瘤细胞。在另一方面,所述细胞为 vero 细胞。在另一方面,所述细胞是通过流式细胞术分类的。在另一方面,所述细胞为原代细胞。在另一方面,所述原代细胞为胚胎干细胞。在另一方面,所述原代细胞是 B- 细胞来源的。在另一方面,所述细胞原代细胞是 T- 细胞来源的。在另一方面,所述细胞为 B- 细胞或 B- 细胞来源的。在另一方面,所述细胞为 T- 细胞或 T- 细胞来源的。在另一方面所述细胞。在另一方面,所述细胞是通过微观流体装置分离的。在另一方面,所述细胞是通过单细胞亚克隆分离的。

[0062] 在任何本发明的方法的一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.01% wt/wt 的热休克蛋白。在该实施方案的一方面,所述热休克蛋白为水稻热休克蛋白。在另一方面,所述热休克蛋白选自水稻 HSP70 基因和水稻胚乳管腔结合蛋白。在另一方面,热休克蛋白选自水稻 (gb|ACJ54890.1|)、EEC69073/OsI_37938 和 AAB63469。

[0063] 在任何本发明的方法的另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.01% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.04% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.06% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白至少约 0.08% wt/wt 的 HSP70。在另一方面,所述重组白蛋白包含至少约 0.1% wt/wt 的 HSP70。

[0064] 在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白相关蛋白为乳铁蛋白。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白相关蛋白为转铁蛋白。在任何本发明的方法的一方面,所述乳铁蛋白是人的。在任何本发明的方面的一方面,所述转铁蛋白是人的。在任何本发明的方法的一方面,所述乳铁蛋白是重组的。在任何本发明的方法的一方面,所述转铁蛋白是重组的。

[0065] 在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 50 至约 1 比 200。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 75 至约 1 比 180。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 80 至约 1 比 120。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 120 至约 1 比 200。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 200 至约 1 比 1000。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 1000 至约 1 比 2000。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 2000 至约 1 比 3000。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 3000 至约 1 比 4000。在任何本发明的方法的另一方面,所述转铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 4000 至约 1 比 5000。

[0066] 在任何本发明的方法的另一方面,所述乳铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 3 至约 1 比 0.33。在任何本发明的方法的另一方面,所述乳铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 0.5 至约 1 比 2。在任何本发明的方法的另一方面,所述乳铁蛋白与白蛋白的比例为约 1 比 0.8 至约 1 比 1.2。

[0067] 在任何本发明的包含乳铁蛋白的方法的另一方面,加入所述乳铁蛋白至终浓度在约 100mg/L 和 400mg/L 之间。在任何本发明的包含乳铁蛋白的方法的另一方面,加入所述乳铁蛋白至终浓度在约 400mg/L 和 800mg/L 之间。在任何本发明的包含乳铁蛋白的方法的另一方面,加入所述乳铁蛋白至终浓度在约 800mg/L 和 1000mg/L 之间。在任何本发明的包

含乳铁蛋白的方法的另一面,加入所述乳铁蛋白至终浓度在约 1000mg/L 和 2000mg/L 之间。

[0068] 在任何本发明的包含转铁蛋白的方法的另一面,加入所述转铁蛋白至终浓度在约 1 μ g/L 和 50 μ g/L 之间。在任何本发明的包含转铁蛋白的方法的另一面,加入所述转铁蛋白至终浓度在约 2 μ g/L 和 10 μ g/L 之间。在任何本发明的包含转铁蛋白的方法的另一面,加入所述转铁蛋白至终浓度在约 3 μ g/L 和 8 μ g/L 之间。在任何本发明的包含转铁蛋白的方法的另一面,加入所述转铁蛋白至终浓度在约 4 μ g/L 和 6 μ g/L 之间。

[0069] 在任何本发明的方法的另一面,加入所述重组白蛋白至终浓度在约 100mg/L 和 2000mg/L 之间。在任何本发明的方法的另一面,加入所述重组白蛋白至终浓度在约 200mg/L 和 1000mg/L 之间。

[0070] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 30%。

[0071] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 40%。

[0072] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 50%。

[0073] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 60%。

[0074] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下测量时,与单独重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白的总计效果相比,细胞的活力提高大于 70%。

[0075] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 80%。

[0076] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 90%。

[0077] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下。与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 100%。

[0078] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 150%。

[0079] 在任何本发明的方法的另一面,在相同培养条件下,与单独加入重组白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时的总计效果相比,细胞的活力提高大于 200%。

[0080] 通过下文的检测或通过本发明实践的学习,本发明的其他新特点和优点对于本领域技术人员会变得明显。

附图说明

[0081] 为了更完整地理解本发明,由此满足的需要以及其目的、特点和优点,结合附图来描述本发明。

[0082] 图 1 为密码子优化的人乳铁蛋白序列 (“cod opt lac”) 与天然人乳铁蛋白序列 (“native lac”) 的比较,比对以示出 693 个密码子,有 413 个 (59.6%) 密码子变化和 467 个 (22.5%) 核苷酸变化。

[0083] 图 2 为 5,817bp 质粒 API164(GT1-Lac) 的质粒图谱,示出了人乳铁蛋白的表达盒,并且含有 Gt1 启动子、Gt1 信号肽、密码子优化的人乳铁蛋白、Nos 终止子和卡那霉素抗性选择标记。

[0084] 图 3 示出了重组人乳铁蛋白表达的 SDS-PAGE 分析结果。将来自水稻种子提取物的总蛋白悬浮在 Laemli 样品缓冲液中,在梯度凝胶上跑并用考马斯蓝染色。泳道 1 为分子量标记。泳道 3 至 6 为纯化的人源性乳铁蛋白 (Sigma Chemical,USA)。泳道 8 至 13 为来自纯合的独立转基因水稻系的单种子提取物,而泳道 14 为来自未转化的水稻品种 Taipei 309 的种子提取物。

[0085] 图 4 为从 R_2 至 R_{10} 代转基因稻米中重组人乳铁蛋白的稳定表达。用 40ml 提取缓冲液从 1g 糙米粉提取总可溶性蛋白并通过离心来澄清。通过 ELISA 来分析提取物。重复提取三次并且标准差如误差棒所示。

[0086] 图 5 示出了 Gt1 信号肽 (Gt1 SP) 和基于来自 P02768 (Swiss-Prot) 的天然蛋白序列的密码子优化的人白蛋白 (OPTIMIZED HSA) 之间融合的 DNA 和蛋白序列。

[0087] 图 6 为 5,496bp 质粒 API504(GT1-HSA) 的质粒图谱,示出了人白蛋白的表达盒,并且含有 Gt1 启动子、Gt1 信号肽、密码子优化的人白蛋白、Nos 终止子和卡那霉素抗性选择标记。

[0088] 图 7 为 12,388bp 质粒 API508(JH/GT1-HSA) 的质粒图谱,示出了人血清白蛋白 (HSA) 的表达盒,并且含有 Gt1 启动子、Gt1 信号肽、密码子优化的人白蛋白、Nos 终止子和卡那霉素抗性选择标记。

[0089] 图 8 示出了通过 HPLC 大小排阻层析的从水稻产生的重组 HSA 与其他来源的白蛋白和纯化方法的比较。图 8A 示出了血清来源的 (非重组 HSA) 层析谱。图 8B 示出了利用“旧工艺”B000 纯化所产生的水稻重组 HSA(Cellastim P0107) 的层析谱。图 8C 示出了利用“新工艺”B0000C 纯化所产生的水稻重组 HSA(Cellastim P0171) 的层析谱。图 8D 示出了血清来源的白蛋白 (1A;虚线) 和利用新工艺制备的 Cellastim HSA (1C;实线) 的层析谱的叠加。图 8E 示出了利用旧工艺 B000 制备的 HSA(Cellastim P0107) (1B;虚线) 和利用新工艺 B0000C 制备的 HSA(Cellastim P0171) (1C;实线) 的层析谱的叠加。

[0090] 图 9 示出了通过 SDS PAGE 分析的从水稻产生的重组白蛋白与其他来源的 HSA 和纯化方法的比较。图 9A 示出了 Cellastim P0171 白蛋白和 Cellprime 白蛋白 (Millipore/Novozymes) 的比较。泳道 1 为分子量标记。泳道 4 为 Cellastim 白蛋白 (10 μ g),而泳道 7 为 Cellprime 白蛋白 (10 μ g)。图 9B 示出了通过 SDS PAGE 分析的来自以前的工艺 (B000) 的三批 Cellastim (泳道 2、3 和 4) 和新 Cellastim 工艺 (B0000C) (泳道 6、7 和 8) 的比较。6 个样品以 20 μ g 每泳道上样。

[0091] 图 10 :示出了酵母重组 HSA(Cellprime)、人血浆来源 HSA(Seracare) 和植物重组 HSA(Cellastim P0171) 关于其促进细胞生长和活力的能力的效果的比较 (图 10A)。图 10B 示出了将旧工艺 (B000) 和新工艺 (B0000C) 用于重组白蛋白生产所产生的批量白蛋白的内毒素水平的比较。图 10C 示出了在将旧工艺 (B000) 和新工艺 (B0000C) 用于重组白蛋白生产所产生的 Cellastim HSA 存在下生长的细胞的生长和活力的比较。

[0092] 图 11 :示出了两个独立实验的蛋白印迹,显示植物来源的重组 HSA 包含可以通过 ATP 亲和柱选择性浓缩 (泳道 4 和 9) 并与抗 HSP 抗体反应的蛋白。泳道 3 和 7 示出了 10 μ g

起始原料；泳道 4 和 9 示出了从 ATP 亲和柱洗脱和纯化之后的部分；泳道 5 和 8 示出了用 ATP 洗脱之后的洗涤穿过液 (wash through)，而泳道 10 为 hsp 阳性对照。（详见实施例 9）。

[0093] 图 12：示出了使利用新工艺产生的白蛋白通过 ATP 亲和柱以去除热休克蛋白之后 Cellastim 重组白蛋白的细胞生长和活力效果的比较。（详见正文）。

[0094] 图 13：示出了与转铁蛋白 (pTF) 组合的 1g/L 重组植物来源人血清白蛋白 (rHSA) 和与转铁蛋白 (pTF) 组合的相同浓度血浆来源人血清白蛋白 (pHSA) 对通过培养杂交瘤细胞生产抗体的影响的比较。

[0095] 优选实施方案详述

[0096] 定义

[0097] 为了本公开可以更易于理解，首先定义某些术语。额外的定义在整个详细说明中阐明。除非另有说明，本文所用的所有术语具有下文给出的含义，或者一般与该术语对本发明领域技术人员所具有的相同含义一致。对于本领域的定义和术语，从业者特别参考 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel FM et al. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.; 和 Gelvin and Schilperroot, eds. (1997) *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

[0098] 术语“约”或“大约”表示本领域普通技术人员所测定的特定值在可接受的误差范围之内，其部分取决于该值是怎样测量或测定的，即测量系统的局限性。例如，“约”可以表示本领域中每次实践在 1 或多于 1 标准差之内。可选地，关于组合物的“约”可以表示加上或减去多达 20% 的范围，优选多达 10%，更优选多达 5%。

[0099] 术语“抗原结合片段”指结合抗原或与完整抗体（即与其来源的完整抗体）竞争抗原结合（即特异性结合）的免疫球蛋白或抗体的多肽部分。结合片段可以通过重组 DNA 技术或者通过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割来产生。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂、Fv、单链和单链抗体。

[0100] 术语“细胞凋亡”（“正常”或“程序性”细胞死亡）指发育或其他正常生物过程中不需要或无用的细胞被消除的生理过程。细胞凋亡是在正常生理条件下发生的细胞死亡模式，并且细胞是其自身死亡的积极参与者（“细胞自杀”）。其最经常在正常细胞更新和组织稳态、胚胎发生、免疫耐受的诱导和维持、神经系统发育以及内分泌依耐性组织萎缩过程中发现。细胞凋亡还可以在组织培养条件下生长的细胞中对应激反应而触发。经历凋亡的细胞表现出特征性形态学和生物化学特点，可以很容易测量和定量。这些特点包括染色质聚集，核和胞质凝聚，胞质和核分配入含有核糖体、形态完整的线粒体和核物质的膜结合小泡（凋亡小体）。在体内，这些凋亡小体迅速被识别并被巨噬细胞或相邻的上皮细胞吞噬。由于体内该去除凋亡细胞的有效机制，没有引起炎症反应。在体外，凋亡小体和剩余的细胞碎片最终膨胀并最后溶解。该体外细胞死亡的末期称为“继发性坏死”。

[0101] 如本文所用，术语“细胞 (cell)”、“细胞 (cells)”、“细胞系”、“宿主细胞 (host cell)”和“宿主细胞 (host cells)”可交替使用，并且涵盖植物和动物细胞，并且包括无脊椎动物、非哺乳类脊椎动物和哺乳动物细胞。所有这样的名称包括细胞群体和后代。因此，术语“转化子”和“转染子”包括原代主体细胞和由此衍生的细胞系，不考虑转移次数。示

例性非哺乳类脊椎动物细胞包括,例如,禽类细胞、爬行动物细胞和两栖动物细胞。示例性无脊椎动物细胞包括但不限于昆虫细胞,例如蠅(草地贪夜蛾)细胞、蚊(埃及伊蚊)细胞、果蝇(黑腹果蝇)细胞、Schneider 细胞和家蚕细胞。参见,例如,Luckow et al.,*Bio/Technology* 6:47-55(1988)。细胞可以为分化、部分分化或未分化的,例如干细胞,包括胚胎干细胞和多能干细胞。来源于器官或器官系统的额外的组织样品可以根据本发明使用。示例性哺乳动物细胞包括,例如,来源于人,非人灵长类,猫,狗,绵羊,山羊,奶牛,马,猪,兔,包括小鼠、仓鼠、大鼠和豚鼠在内的啮齿类的细胞,以及其任何衍生物和后代。

[0102] 术语“细胞培养”或“组织培养”指在诸如滚瓶、组织培养瓶、皿、多孔板等的容器中悬浮生长或粘附至的各种表面或基质生长的细胞。术语“细胞培养”还涵盖诸如生物反应器的大规模方法,包括在搅动发酵罐中附着至微载体生长的贴壁细胞。此外,在本发明的方法中不仅可以培养接触依赖性细胞,而且可以使用悬浮培养技术。示例性微载体包括,例如,葡聚糖、胶原、塑料、明胶和纤维素以及如 Butler, Spier & Griffiths, *Animal cell Biotechnology* 3:283-303(1988) 所述的其他微载体。还可以使用诸如 Cytoline™ 或 Cytopore™ 的多孔载体,以及诸如 DEAE-葡聚糖 (Cytodex 1™ 季铵包被葡聚糖 (Cytodex™)) 的基于葡聚糖的载体,或者诸如明胶包被葡聚糖 (Cytodex 3™) 的基于明胶的载体。本发明涵盖大规模和小规模蛋白生产的细胞培养方法。方法包括但不限于,可以使用流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养或搅动釜生物反应器系统,有或无微载体,并且可选地以一批、补料分批或灌注模式操作。

[0103] 术语“细胞培养基 (cell culture medium)”、“细胞培养基 (cell culture media)”和“培养基”指用于生长、保存、操作和维持细胞和细胞系的溶液。这样的溶液一般包括细胞附着、生长和维持细胞环境所必需的各种因子。例如,典型的溶液可以包括基础培养基配方,取决于细胞类型的各种补充物,并且偶尔包括抗生素。在一些实施方案中,溶液可以包括来自一种或多种以下类型的至少一种组分:1) 能量来源,通常以诸如葡萄糖的碳水化合物形式;2) 所有必需氨基酸,并且通常为基本一套 20 个氨基酸加上胱氨酸;3) 维生素和/或其他有机化合物,需要低浓度;4) 游离脂肪酸;和 5) 微量元素,这里微量元素定义为典型需要非常低浓度的无机化合物或自然存在的元素,通常在微摩尔范围内。所述溶液可以任选地补充来自以下任何类型的一种或多种组分:1) 激素和其他生长因子,例如,胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子;2) 盐和缓冲液,例如,钙、镁、磷酸盐、Tris、HEPES 和碳酸氢钠;3) 核苷和碱基,例如,腺苷和胸苷、次黄嘌呤;和 4) 蛋白和组织水解产物。总的来说,可以使用任何合适的细胞培养基。培养基可以包含血清,例如胎牛血清、小牛血清或类似物。可选地,培养基可以无血清、无动物或无蛋白。

[0104] 术语“细胞培养基组分”或“细胞培养组分”指用作细胞培养基补充物的任何异源蛋白。

[0105] 术语“细胞培养基成分”包括细胞培养基组分、蛋白、肽、激素、碳水化合物、氨基酸、脂质、维生素、抗生素、有机和无机盐。

[0106] 术语“细胞培养基补充物”指一种或多种细胞培养基组分的组合,有或无其他成分,用于添加至细胞培养基。

[0107] 术语“细胞培养基基础”或“基础培养基”指细胞培养基,其可以含有例如以下任何或全部组分:蛋白、肽、脂质、碳水化合物、氨基酸、有机和/或无机盐、缓冲液(例如,碳酸

氢盐)、维生素、激素、抗生素和 pH 指示剂(例如,酚红)。可以按照本发明使用的细胞培养基基础的实例包括:达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(DME)、Ham's 营养混合物、MCDB 培养基、伊格尔极限必需培养基(Minimum Essential Medium Eagle)、RPMI 培养基、Ames'培养基、BGJb 培养基(Fitton-Jackson 改良)、Click's 培养基、CMRL-1066 培养基、Fischer's 培养基、格拉斯哥极限必需培养基(Glasgow Minimum Essential Medium)(GMEM)、伊思考夫改良达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(IMDM)、L-15 培养基(Leibovitz)、McCoy's 5A 改良培养基、NCTC 培养基、Swim's S-77 培养基、Waymouth 培养基和 William's 培养基 E。细胞培养基基础可以用细胞培养基组分或细胞培养基补充物来补充。

[0108] 当涉及干细胞培养时,术语“细胞系”指一种细胞类型发育的所有阶段,从最早的前体细胞到完全成熟细胞(即特化细胞)。

[0109] 术语“细胞的活力”或“活力”指在任何给定时间细胞群体显示的活细胞和死细胞的相对量。细胞的活力可以通过测量任何给定群体样品中活细胞和死细胞的相对数量来测定。细胞的活力还可以通过测量代表细胞生长率和细胞死亡率的综合平衡的整个群体的细胞增殖率来估计。细胞生长率还可以通过计数细胞数量和通过使用任何数量直接评分细胞生长率的商购细胞增殖测定来直接测量。

[0110] “条件培养基”指从饲养细胞培养物获得的细胞培养基,在其中胚胎干细胞可以培养并维持多能状态。饲养细胞消耗条件培养基的一些组分,但是也丰富培养基的细胞衍生物,可能包括少量生长因子。本文所用的术语“饲养细胞因子”表示饲养细胞释放入条件培养基的细胞衍生物。释放入细胞培养基的细胞因子有利于促进胚胎干细胞生长或维持胚胎干细胞处于多能状态。饲养细胞因子可以利用本领域技术人员已知和本文所述的技术来鉴别和纯化。

[0111] 短语“保守氨基酸取代”或“保守突变”指一个氨基酸被另一个具有共有特性的氨基酸置换。界定单个氨基酸之间的共有特性的有用方法是分析同源生物的相应蛋白之间氨基酸变化的标准化频率(Schulz, G.E. and R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。根据这样的分析,可以界定氨基酸组,组内的氨基酸优选互换,并且因此对总体蛋白结构的影响互相最类似(Schulz, G.E. and R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。

[0112] 以该方式界定的氨基酸组的实例包括:“带电/极性组”,由 Glu、Asp、Asn、Gln、Lys、Arg 和 His 组成;“芳香族或环状组”,由 Pro、Phe、Tyr 和 Trp 组成;“脂肪族组”,由 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Ser、Thr 和 Cys 组成。

[0113] 在每个组内,还可以鉴别亚组,例如,带电/极性氨基酸组可以再分为由“带正电亚组”、“带负电亚组”和“极性亚组”组成的亚组,“带正电亚组”由 Lys、Arg 和 His 组成;“带负电亚组”由 Glu 和 Asp 组成;“极性亚组”由 Asn 和 Gln 组成。芳香族或环状组可以再分为由“氮环亚组”和“苯基亚组”组成的亚组,“氮环亚组”由 Pro、His 和 Trp 组成;“苯基亚组”由 Phe 和 Tyr 组成。脂肪族组可以再分为由“大脂肪族非极性亚组”、“脂肪族轻微极性亚组”和“小残基亚组”组成的亚组,“大脂肪族非极性亚组”由 Val、Leu 和 Ile 组成;“脂肪族轻微极性亚组”由 Met、Ser、Thr 和 Cys 组成;“小残基亚组”由 Gly 和 Ala 组成。

[0114] 保守突变的实例包括以上亚组内氨基酸的取代,例如, Lys 取代 Arg 并且反之亦

然,这样可以保持正电荷 ;Glu 取代 Asp 并且反之亦然,这样可以保持负电荷 ;Ser 取代 Thr,这样可以保持游离 -OH ;以及 Gln 取代 Asn,这样可以保持游离 -NH₂。

[0115] 术语“细胞毒性”指化合物(例如化学或蛋白污染物、去污剂或者毒素)杀死细胞的特性。与坏死和细胞凋亡相比,术语细胞毒性不需要指出特定的细胞死亡机制。

[0116] 如本文所用,术语“减少”或相关术语“减少的”、“降低”或“降低的”指统计学上显著减少。为了避免疑问,该术语一般指给定参数至少减少 10%,并且可以涵盖至少减少 20%、减少 30%、减少 40%、减少 50%、减少 60%、减少 70%、减少 80%、减少 90%、减少 95%、减少 97%、减少 99%或甚至 100%(即测量的参数为零)。

[0117] 如本文所用,当用于描述干细胞时,术语“发育”、“分化”和“成熟”指细胞从具有潜能的阶段到分化为至少两种不同的细胞系以成为特化和终末分化细胞的进程。为了本发明的目的,这样的术语可以交替使用。

[0118] 如本文所用的术语“表达”指宿主细胞内核苷酸序列的转录和/或翻译。宿主细胞中期望产物的表达水平可以在细胞中存在的相应 mRNA 量或所选序列编码的期望多肽量的基础上确定。例如,从所选序列转录的 mRNA 可以通过 RNA 印迹杂交、核糖核酸酶 RNA 保护、细胞 RNA 的原位杂交或通过 PCR 来定量。所选序列编码的蛋白可以通过各种方法来定量,所述方法包括但不限于,例如,ELISA、蛋白印迹、放射免疫测定、免疫沉淀、测定蛋白的生物活性,或者通过蛋白免疫染色然后 FACS 分析。

[0119] “表达控制序列”是为宿主细胞中编码序列的表达提供的 DNA 调控序列,例如启动子、增强子、多腺苷酸化信号、终止子、内部核糖体进入位点(IRES)等。示例性表达控制序列如 Goeddel ;Gene Expression Technology ;Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 所述。

[0120] 术语“饲养细胞”指体外生长和分泌至少一种因子至培养基并且可以用于支持培养的另一种所关注的细胞的生长的培养细胞。如本文所用,术语“饲养细胞层”可以与术语“饲养细胞”交替使用。饲养细胞可以包含单层,在互相上方生长之前,饲养细胞整层覆盖培养皿的表面 ;或者可以包含细胞团。

[0121] 细胞培养的术语“生长期”指细胞以恒定速率分裂的指数细胞生长时期(对数期)。在该时期,在最大化细胞生长这样的条件下培养细胞一段时间。对于设想的特定宿主细胞,宿主细胞生长周期的确定可以不用过度的实验来确定。“一段时间和在最大化细胞生长这样的条件下”等指对于特定细胞系,确定对细胞生长和分裂最佳的培养条件。在生长期,通常在约 30-40℃下,一般在约 37℃下在含有必需添加剂的营养培养基中在加湿、控制的空气中培养细胞,这样实现特定细胞系的最佳生长,例如哺乳动物细胞。

[0122] 术语“异源 DNA”指被引入细胞的 DNA,其源自另一来源,或者来自相同来源但位于不同(即非天然)环境。术语“异源蛋白”或“重组蛋白”指全部或部分由异源 DNA 编码的蛋白,或者从完全或部分由异源 DNA 产生的激活内源基因表达的表达控制序列(例如启动子或增强子)表达的蛋白。

[0123] 术语“同源性”描述了基于算术的序列相似性比较,其用于找出具有相似功能或基序的基因或蛋白。本发明的核酸和蛋白序列可以用作“查询序列”来对公共数据库进行搜索,以便例如找出其他家族成员、相关序列或同系物。这样的搜索可以利用 Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215 :403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(版本 2.0)来进行。BLAST

核苷酸搜索可以用 NBLAST 程序、分数 = 100、字长 = 12 来进行以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白搜索可以用 XBLAST 程序、分数 = 50、字长 = 3 来进行以获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了比较的目的,可以如 Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17) :3389-3402 所述利用缺口 BLAST 以获得缺口比对。当利用 BLAST 和缺口 BLAST 程序时,可以使用各个程序(例如, XBLAST 和 BLAST) 的默认参数。

[0124] 术语“同源”指具有“共同进化起源”的两种蛋白之间的关系,包括同一动物物种中来自超家族(例如,免疫球蛋白超家族)的蛋白,以及来自不同动物物种的同源蛋白(例如,肌球蛋白轻链多肽等;参见 Reeck et al., *Cell*, 50 :667, 1987)。这样的蛋白(和编码它们的核酸)具有序列同源性,正如它们的序列相似性所反映的,无论在相同性百分比方面或通过特定残基或基序以及保守位置的存在。

[0125] 术语“生长因子”指双调蛋白、血管生成素、 β 动物纤维素 (Betacellulin)、骨形态发生蛋白 (Bone Morphogenic protein)-13、骨形态发生蛋白 -14、骨形态发生蛋白 -2、人 BMP-3、骨形态发生蛋白 -4、人 BMP-5、骨形态发生蛋白 -6、骨形态发生蛋白 -7、人 CD135 配体 /Flt-3 配体、人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、人巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、人 Cripto-1、人 CTGF (结缔组织生长因子)、人 EGF (表皮生长因子)、人 EG-VEGF (内分泌腺源性血管内皮生长因子)、人红细胞生成素 (EPO)、人 FGF (成纤维细胞生长因子 1-23)、人 GDF-11、人 GDF-15、人 GDF-8、人生长激素释放因子 (GHRF、GRF、GHRH、生长激素释放激素)、人肝素结合性表皮生长因子 (HB-EGF)、人肝细胞生长因子 (HGF)、人调蛋白 β 1、人胰岛素、人 IGF-1 (胰岛素样生长因子 -1)、人 IGF-2 (胰岛素样生长因子 -2)、人 IGFBP-1 (胰岛素样生长因子结合蛋白 1)、人 IGFBP-3 (胰岛素样生长因子结合蛋白 3)、肠三叶因子 (ITF)、人角质形成细胞生长因子 1 和 2、人白血病抑制因子 (LIF)、人 MSP、人肌肉生长抑制素、人肌肉生长抑制素、原 (前肽) (pro(propeptide))、人 NRG1、人 NGF、人制癌蛋白 M、人成骨细胞特异性因子 1 (OSF-1、多效营养因子)、人 PD-ECGF (血小板源性内皮细胞生长因子)、人 PDGF、人 PIGF、人胎盘生长因子 1 (PLGF1)、人胎盘生长因子 2 (PLGF2)、人 SCGF- α (干细胞生长因子 - α)、人 SCGF- β (干细胞生长因子 - β)、人干细胞生长因子 (SCF)/CD117 配体、人血小板生成素 (TPO、THPO)、人转化生长因子、人 TGF- α (转化生长因子 - α 、TGF α)、人 TGF- β 1 (转化生长因子 - β 1、TGF β)、人 TGF- β 1.2 (转化生长因子 - β 1、TGF β)、人 TGF- β 2 (转化生长因子 - β 2、TGF β)、人 TGF- β 3 (转化生长因子 - β 3、TGF β)、人 VEGF (血管内皮生长因子)、人 VEGF-121、人 VEGF-165 和人 VEGF-A。

[0126] 如本文所用,“相同性”表示当比对序列以最大化序列匹配时,即考虑缺口和插入时,在两个或更多个序列的相应位置相同的核苷酸或氨基酸残基的百分率。通过已知方法可以很容易计算相同性,其包括但不限于 Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48 :1073 (1988)

所述方法。确定相同性的方法设计为给出测试序列之间的最大匹配。此外,确定相同性的方法以公用计算机程序编写。确定两个序列之间相同性的计算机程序方法包括但不限于 GCG 程序包 (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1) :387(1984))、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215 :403-410(1990) and Altschul et al. *Nuc. Acids Res.* 25 :3389-3402(1997))。BLAST X 程序可以从 NCBI 和其他来源公开获得 (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894 ;Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215 :403-410(1990))。众所周知的 Smith Waterman 算法也可以用于确定相同性。

[0127] 术语“免疫球蛋白”或“抗体”(本文可交替使用)指典型地具有由两条重链和两条轻链组成的基本四多肽链结构的蛋白,所述链通过例如链间二硫键来稳定,该蛋白具有特异性结合抗原的能力。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(本文可交替使用)指具有由一条重链和一条轻链组成的二多肽链结构的蛋白,所述链通过例如链间肽接头来稳定,该蛋白具有特异性结合抗原的能力。术语“结构域”指包含肽环的重链或轻链多肽的球状区域(例如,包含 3 至 4 个肽环),其通过例如 β -折叠和 / 或链内二硫键来稳定。本文中结构域还涉及“恒定”或“可变”,其基于对“恒定”结构域而言在各种类成员的结构域内相对缺失序列变异或者对“可变”结构域而言在各种类成员的结构域内的显著变异。本领域中抗体或多肽“结构域”常可交替称为抗体或多肽“区”。抗体轻链的“恒定”结构域可交替称为“轻链恒定区”、“轻链恒定结构域”、“CL”区或“CL”结构域。抗体重链的“恒定”结构域可交替称为“重链恒定区”、“重链恒定结构域”、“CH”区或“CH”结构域。抗体轻链的“可变”结构域可交替称为“轻链可变区”、“轻链可变结构域”、“VL”区或“VL”结构域。抗体重链的“可变”结构域可交替称为“重链恒定区”、“重链恒定结构域”、“VH”区或“VH”结构域。免疫球蛋白或抗体可以为单克隆或多克隆并且可以单体或聚合形式存在,例如,以五聚体形式存在的 IgM 抗体和 / 或以单体、二聚体或多聚体形式存在的 IgA。术语“片段”指抗体或抗体链的局部或部分,其包含少于完整或全部抗体或抗体链的氨基酸残基。片段可以通过化学或酶促处理完整或全部抗体或抗体链来获得。片段还可以通过重组方法来获得。示例性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂ 和 / 或 Fv 片段。

[0128] 如本文所用,术语“增加”或相关术语“增加的”、“提高”或“提高的”指统计学上显著增加。为了避免疑问,该术语一般指给定参数至少增加 10%,并且可以涵盖超过对照值至少增加 20%、增加 30%、增加 40%、增加 50%、增加 60%、增加 70%、增加 80%、增加 90%、增加 95%、增加 97%、增加 99% 或甚至 100%。

[0129] 当用于描述细胞培养组分,即本文公开的白蛋白或转铁蛋白相关蛋白时,术语“分离”表示从其自然环境的组分鉴别及分离和 / 或回收的蛋白。其自然环境的污染物组分是通常会干扰蛋白的研究、诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素以及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中,会将蛋白纯化至至少 95% 同质性,如通过非还原或还原条件下利用考马斯蓝或优选银染色的 SDS-PAGE 所评估的。分离的蛋白包括在重组细胞内的原位蛋白,因为所关注蛋白的自然环境的至少一种组分不会存在。然而,通常分离的蛋白会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0130] 术语“成熟特异性蛋白启动子”指在种子成熟过程中表现出基本上上调活性(大于 25%)的启动子。

[0131] 术语“成熟植物”指完全分化的植物。

[0132] 如本文所用的“标记”是在所关注细胞中差异表达的核酸或多肽分子。在本文中，差异表达对于阳性标记表示水平增加，而对于阴性标记表示水平降低。在所关注细胞中标记核酸或多肽的可检测水平与其他细胞相比足够更高或更低，这样可以利用本领域已知的各种方法中的任一种来鉴别和区分所关注细胞和其他细胞。

[0133] 表达“胰腺内分泌谱系标记”的细胞指具有转录因子 PDX-1 以及至少一种以下转录因子：NGN-3、NRx2.2、NRx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3 β 、MAFA、Pax4 和 Pax6 的阳性基因表达的细胞。表达胰腺细胞系特征标记的细胞包括胰腺 β 细胞。

[0134] 如本文所用的表达“内胚层谱系特征标记”的细胞指表达至少一种以下标记的细胞：SOX-17、GATA-4、HNF-3 β 、GSC、Cer1、Nodal、FGF8、短尾肽 (Brachyury)、Mix 样同源框蛋白、FGF4CD48、脱中胚蛋白 (EOMES)、DKK4、FGF17、GATA-6、CXCR4、C-Kit、CD99 或 OTX2。表达定形内胚层谱系特征标记的细胞包括原条前体细胞、原条细胞、中内胚层细胞和定形内胚层细胞。

[0135] 表达通过本发明的方法获得的多能性标记的细胞表达至少一种以下多能性标记，其选自：ABCG2、cripto、FoxD3、Connexin43、Connexin45、Oct4、SOX-2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tral-60 和 Tral-81。

[0136] 如本文所用的表达“中胚层谱系特征标记”的细胞指表达至少一种以下标记的细胞：CD48、脱中胚蛋白 (EOMES)、SOX-17、DKK4、HNF-3 β 、GSC、FGF17、GATA-6。

[0137] 如本文所用的表达“外胚层谱系特征标记”的细胞指表达至少一种以下标记的细胞：BMP-4、头发生素、脊索发生素、Otx2、Fox J3、巢蛋白、p63/TP73L、 β -III 微管蛋白。

[0138] “单子叶植物种子组分”指可以从单子叶植物种子，典型地从成熟单子叶植物种子提取的碳水化合物、蛋白和脂质组分。

[0139] 如本文所用，关于给定细胞、蛋白、多肽、核酸、性状或表型的术语“天然”或“野生型”指通常在自然中发现的形式。

[0140] 如本文可交替使用的术语“可操作地连接”或“操作性连接”指两个或更多个核苷酸序列或序列元件以允许其按照预期方式发挥功能的方式定位。在一些实施方案中，根据本发明的核酸分子包括一个或多个能够打开染色质和 / 或维持染色质打开状态的 DNA 元件，其可操作地连接至编码重组蛋白的核苷酸序列。在其他实施方案中，核酸分子还可以包括一个或多个核苷酸序列，选自：(a) 能够增加翻译的核苷酸序列；(b) 能够增加细胞外重组蛋白分泌的核苷酸序列；和 (c) 能够增加 mRNA 稳定性的核苷酸序列，这样的核苷酸序列操作性连接至编码重组蛋白的核苷酸序列。一般但不是必需，可操作连接的核苷酸序列是邻接的，并且必要时在阅读框中。然而，虽然能够打开染色质和 / 或维持染色质打开状态的可操作连接的 DNA 元件一般位于编码重组蛋白的核苷酸序列的上游；其不必需邻接。各种核苷酸序列的可操作连接通过本领域众所周知的重组方法完成，例如利用 PCR 方法，通过在合适的限制位点连接或通过退火。如果不存在合适的限制位点，可以根据常规做法使用合成的寡核苷酸接头或连接物。

[0141] “植物细胞”指来源于植物的任何细胞，包括未分化组织（例如，胼胝体）以及植物种子、花粉、繁殖体、胚、悬浮培养物、分生组织区、叶、根、枝条、配子体、孢子体和小孢子。

[0142] 本文可交替使用的术语“多核苷酸”和“核酸分子”指任何长度的核苷酸的聚合形

式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。这些术语包括单链、双链或三链 DNA,基因组 DNA,cDNA, RNA, DNA-RNA 杂交分子或者包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学、生物化学修饰、非天然或衍生的核苷酸碱基的多聚体。多核苷酸的骨架可以包含糖和磷酸盐基团(如通常可以在 RNA 或 DNA 中发现的),或者修饰或替代糖或磷酸盐基团。此外,双链多核苷酸可以通过合成互补链并在适当条件下退火链或者通过利用 DNA 聚合酶和适当的引物从头合成互补链来从化学合成的单链多核苷酸获得。核酸分子可以采取许多不同形式,例如,基因或基因片段、一个或多个外显子、一个或多个内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核糖核酸酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含诸如甲基化核苷酸和核苷酸类似物的修饰核苷酸,尿嘧啶,诸如氟核糖(fluororibose)和 thioate 的其他糖和连接基团以及核苷酸分支。如本文所用,“DNA”或“核苷酸序列”不但包括碱基 A、T、C 和 G,而且还包括任何其类似物或这些碱基的修饰形式,例如甲基化核苷酸,诸如不带电的连键和 thioate 的核苷酸间修饰,使用糖类似物以及诸如聚酰胺的修饰和 / 或可选骨架结构。

[0143] 术语“多能干细胞”涵盖从胚胎、胎儿或成体组织获得的干细胞。在一优选实施方案中,多能干细胞为胚胎干细胞。在另一实施方案中,多能干细胞为胎儿干细胞,例如生殖细胞。在另一实施方案中,多能干细胞为成体干细胞。

[0144] 如本文所用,术语“多能”指能够至少发育成一种外胚层、内胚层和中胚层细胞的细胞。如本文所用,术语“多能”包括全能和多能细胞。如本文所用,术语“全能细胞”指能够发育成所有细胞系的细胞。术语“多能”指未终末分化的细胞。

[0145] “启动子”是能够在细胞中结合 RNA 聚合酶并启动下游(3' 方向)编码序列转录的 DNA 调控区。如本文所用,启动子序列在其 3' 末端结合转录起始位点,并且向上游(5' 方向)延伸以包括启动在背景以上的可检测水平的转录所必需的最少碱基或元件。转录起始位点(方便地通过用核酸酶 S1 作图来确定)以及负责结合 RNA 聚合酶的蛋白结合结构域(共有序列)可以在启动子序列内发现。真核启动子可以经常但不总是含有“TATA”盒和“CAT”盒。原核启动子除 -10 和 -35 共有序列之外含有 SD 序列。

[0146] 包括组成型、诱导型和阻抑型启动子在内的来自各种不同来源的大量启动子为本领域众所周知。代表性来源包括例如病毒、哺乳动物、昆虫、植物、酵母和细菌细胞类型,并且来自这些来源的合适的启动子可以很容易获得,或者可以基于可在线公开获得的序列合成来产生,或者例如来自诸如 ATCC 的存放处以及其他商业或个人来源。启动子可以为单向(即启动一个方向的转录)或双向(即启动 3' 或 5' 方向的转录)。启动子的非限制性实例包括,例如,T7 细菌表达系统、pBAD(araA) 细菌表达系统、巨细胞病毒(CMV) 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子、水稻胚乳特异性谷蛋白(Gt1) 启动子、CaMV35S 病毒启动子。诱导型启动子包括 Tet 系统(美国专利 5,464,758 和 5,814,618)、蜕皮激素诱导系统(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996)93(8):3346-3351)、T-REx™ 系统(Invitrogen Carlsbad, CA)、LacSwitch® (Stratagene, (San Diego, CA) 和 Cre-ER^T 他莫昔芬诱导重组酶系统(Indra et al. Nuc. Acid. Res. (1999)27(22):4324-4327; Nuc. Acid. Res. (2000)28(23):e99; 美国专利第 7,112,715 号;和 Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol. (2005)308:123-144),或者本领域已知的适合在期望细胞中表达的任何启动子。

[0147] 术语“所关注蛋白”指可以对研究、诊断或治疗目的有用的任何蛋白。所关注蛋

白可以包含哺乳动物蛋白或非哺乳动物蛋白,并且可以任性包含受体或配体。示例性所关注蛋白包括但不限于:诸如肾素的分子;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺素;促甲状旁腺素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子,例如因子VIII C、因子IX、组织因子和血管性血友病因子;抗凝血因子,例如蛋白C;心钠素;肺表面活性物质;纤溶酶原激活物,例如尿激酶或者人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;TNF和TNF受体(TNFR)家族成员,如肿瘤坏死因子- α 和- β 、CD40配体、Apo-2配体/TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2、DcR3、OPG、Fas配体;脑啡肽酶;RANTES(调节激活正常T细胞表达和分泌因子);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,例如人血清白蛋白;苗勒抑制物质(Muellerian-inhibiting substance);松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,例如 β -内酰胺酶;脱氧核糖核酸酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),例如CTLA-4;抑制素;激活蛋白;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,例如骨源性神经营养因子(BDNF),神经营养蛋白-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6),或者神经生长因子,例如NGF- β ;血小板源性生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,例如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),例如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TG- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白,例如CD3、CD4、CD8、CD19和CD20;红细胞生成素;骨生成诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素,例如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;血小板生成素(TPO);白介素(IL),例如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如,部分AIDS包膜、gp120;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,例如HER2、HER3或HER4受体;和以上所列任何多肽的变体和/或变体;以及抗诸如CD蛋白的各种蛋白抗原的抗体,例如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20和CD34;ErbB受体受体家族成员,例如EGF受体,HER2、HER3或HER4受体;细胞粘附分子,例如LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和包括其 α 或 β 亚基在内的 α v/ β 3整联蛋白(例如抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体);生长因子,例如VEGF;IgE;血型抗原;flk2/flt3受体;肥胖(OB)受体;mp1受体;CTLA-4;蛋白C;Apo-2L受体,例如Apo-2(DR5)、DR4、DcR1、DcR2、DcR3;和以上确定的抗体的变体和/或片段等。在本发明的一实施方案中,所关注蛋白会包含自身能够在体内或体外的哺乳动物或非哺乳动物中诱导细胞凋亡的蛋白,例如Apo-2配体/TRAIL、Fas配体或TNF- α 。

[0148] 细胞培养的术语“生产期”指细胞生长已达到平台的这段时间。在生产期,对数细胞生长已结束并且蛋白生产是主要的。在这段时间一般补充培养基以支持持续的蛋白生产并获得期望的蛋白产物。

[0149] 当用于描述本文公开的细胞培养组分时,术语“在植物中产生”表示蛋白是直接或间接从植物细胞获得的。关于重组蛋白,术语“在植物中产生”表示重组蛋白在植物细胞内表达,然后从宿主细胞蛋白和脂质纯化。在植物中产生的蛋白可以通过至少三个标准与其他生物纯化的蛋白区分。1) 在植物中产生的蛋白通常包含与在不同生物中产生的蛋白

相比不同的翻译后修饰模式,其可以很容易地通过质谱分析来鉴定。2) 在植物中产生的蛋白通常包含与在不同表达系统中产生或从不同来源纯化的相同蛋白相比不同的一套结合辅因子、脂质和污染蛋白。3) 在植物中产生的蛋白可以表现出与从不同来源产生或纯化的相同蛋白相比不同的生物活性。在植物中产生的蛋白活性的不同可以由在植物中产生的蛋白与从不同生物产生或纯化的蛋白相比不同的构象、折叠、聚集状态、翻译后修饰或结合因子或共纯化的污染蛋白所引起。在植物中产生的蛋白的特定活性的不同可以很容易地通过利用确定浓度和测定条件的常规测定来建立,例如,如实施例 11 至 19 所公开的,利用细胞生长和因子协同作用测定。具体来说,单独或与其他因子组合的在植物中产生的蛋白可以表现出与相同浓度非植物产生的蛋白相比至少多 10% 的细胞生长活性。优选地,单独或与其他因子组合的在植物中产生的蛋白可以表现出与相同浓度非植物产生的蛋白相比至少多 20% 的细胞生长活性。更优选地,单独或与其他因子组合的在植物中产生的蛋白可以表现出与相同浓度非植物产生的蛋白相比至少多 30% 的细胞生长活性。更优选地,单独或与其他因子组合的在植物中产生的蛋白可以表现出与相同浓度非植物产生的蛋白相比至少多 40% 的细胞生长活性。甚至更优选地,单独或与其他因子组合的在植物中产生的蛋白可以表现出与相同浓度非植物产生的蛋白相比至少多 50% 的细胞生长活性。

[0150] 当用于描述本文公开的细胞培养组分时,术语“分离”或“纯化”表示已从其自然环境的组分鉴别并分离和 / 或回收的蛋白。其自然环境的污染物组分是通常会干扰蛋白的研究、诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素以及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中,会将蛋白纯化至至少 95% 同质性,如通过非还原或还原条件下利用考马斯蓝或优选银染色的 SDS-PAGE 所评估的。分离的蛋白包括在重组细胞内的原位蛋白,因为所关注蛋白的自然环境的至少一种组分不会存在。然而,通常分离的蛋白会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0151] 术语“重组蛋白”或“重组多肽”指产生该多肽的细胞的外源,即异源或外来多肽。

[0152] 在细胞凋亡或细胞培养中的术语“应激”指对于组织培养非最佳的条件,包括以下的任何组合;毒素的存在、营养或生长因子消耗或撤除、低氧、热应激(与优选范围相比温度过高或过低)、失去细胞-细胞接触、病毒感染、渗透应激(与优选范围相比重量摩尔渗透压浓度过高或过低)、氧化应激、细胞密度(与优选范围相比细胞密度过高或过低)和 pH 应激(与优选范围相比 pH 过高或过低)。

[0153] 术语“转化”指一种或多种核酸分子转移入宿主细胞或生物。将核酸分子引入宿主细胞的方法包括,例如,磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、显微注射、正离子脂质介导的转染、电穿孔、划痕标记、弹道引入或者用病毒或其他感染剂感染。“转化”、“转导”、“转基因”和“重组”指已引入重组或异源核酸分子(例如,一种或多种 DNA 构建体或 RNA,或者 siRNA 负体)的宿主细胞或生物。核酸分子可以稳定表达(在细胞中以功能形式维持约 3 个月以上),或者在细胞中以功能形式非稳定维持少于 3 个月,即瞬时表达。例如,“转化”、“转化子”和“转基因”细胞已通过转化过程并且含有外源核酸。术语“未转化”指未通过转化过程的细胞。

[0154] 细胞培养的术语“过渡期”指建立用于生产期的培养条件的这段时间。在过渡期,诸如 pH、离子浓度和温度的环境因子从生长条件转变至生产条件。

[0155] 术语“种子产物”包括但不限于诸如脱皮的整个种子的种子部分,面粉(已通过磨

来脱皮并研磨成粉末的种子)种子提取物,优选蛋白提取物(面粉的蛋白组分已从碳水化合物组分分离),麦芽(包括麦芽提取物或麦芽糖浆)和/或来源于转基因籽粒的纯化的蛋白组分。

[0156] “种子成熟”指从受精开始的时期,其中诸如糖、寡糖、淀粉、酚类、氨基酸和蛋白的可代谢储备被储存至种子(籽粒)中的各种组织,例如胚乳、种皮、糊粉层和盾片状上皮,有或无液泡靶向,导致籽粒扩大、籽粒灌浆,并且以籽粒干燥结束。

[0157] 术语“序列相似性”指可以或可以不共享共同进化起源的核酸或氨基酸序列之间相同性或对应的程度(参见以上 Reeck 等)。然而,在常见使用和本发明中,当用诸如“高度”的副词修饰时,术语“同源”可以指序列相似性并且可以或可以不涉及共同进化起源。

[0158] 在特定实施方案中,如通过已知的诸如 BLAST、FASTA、DNA Strider、CLUSTAL 等的序列比较算法所确定的,当在确定长度的核酸序列上至少约 85%,并且更优选至少约 90%或至少约 95%的核苷酸匹配时,两个核酸序列为“基本上同源”或“基本上相似”。这样的序列的实例为本发明的特定基因的等位或物种变体。基本上同源的序列还可以通过杂交来鉴定,例如在对特定系统所确定的严格条件下的 DNA 杂交实验。

[0159] 相似地,在本发明的特定实施方案中,当大于 80%的氨基酸残基相同时,或者当大于约 90%的氨基酸残基相似(即功能相同)时,两个氨基酸序列为“基本上同源”或“基本上相似”。优选地,相似或同源多肽序列是通过利用例如 GCG(Genetics Computer Group, Version 7, Madison, Wis.) 堆积程序或者利用上述任何程序和算法来鉴定的。程序可以使用 Smith and Waterman 的本地同源性算法,用默认值:缺口生成罚分 = $-(1+1/k)$, k 为缺口延伸数;平均匹配 = 1, 平均错配 = -0.333。

[0160] 如本文和所附权利要求所用,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“这个(the)”包括复数形式,除非上下文明确要求。因此,例如,所指的“一个分子”包括一个或多个这样的分子,“一个试剂”包括一个或多个这样的不同试剂,所指的“一个抗体”包括一个或多个这样的不同抗体,并且所指的“这个方法”包括所指的相等步骤和本领域普通技术人员已知的可以改良或取代本文所述方法的方法。

[0161] 除非另有说明,本发明的实施会使用化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,其在本领域普通技术人员的能力之内。这样的技术在文献中说明。从业者特别参考 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.; Ausubel FM et al. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y.; and Gelvin and Schilperoot, eds. (1997) *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands; , DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O' / D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I* by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN

0-87969-544-7);Antibodies :A Laboratory Manual by Ed Harlow(Editor), David Lane(Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-3,4-2), 1855.Handbook of Drug Screening, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B.Fernandes(2001, New York, N. Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9) ;and Lab Ref : A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Edited Jane Roskams and Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3。这些原文每个援引并入本文。

[0162] 提供以上讨论的出版物仅仅是因为它们在本申请的申请日之前已公开,但均不能理解为承认本发明不能因发明在先的方式而早于此类公开。

[0163] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同的意思。虽然与本文所述相似或相等的任何方法、组合物、试剂、细胞可以用于本发明的实施或测试,优选的方法和材料如本文所述。本文所提到的所有出版物并入本文,包括所有图、图表、方程、插图和绘图,以便描述和披露与引用的参考文献有关的特定信息。

[0164] I. 使用本发明补充物的方法

[0165] 经常,向细胞培养基补充血清至浓度为 5-10%。血清是含有不确定的细胞生长必不可少物质的复杂混合物。通常使用的血清为胎牛血清 (fetal calf serum) (FCS) 和胎牛血清 (fetal bovine serum) (FBS)。由于其复杂性、缺少一致性和病原体污染的潜在风险,细胞培养产业和管理机构正在寻找将血清加入细胞培养基的替代物。

[0166] 加入基础培养基的细胞培养组分和细胞培养补充物在促进细胞生长方面具有不同的功能。这些蛋白组分通常为动物来源的。随着对来自动物来源物质的潜在病原体污染的关注增加,细胞培养产业正在尝试开发无动物组分的培养基。虽然使用利用微生物系统产生的基于植物的水解产物和重组蛋白已取得一些成功,但是基于植物的水解产物是不确定的组分混合物,并且来自微生物来源的重组蛋白在常规细胞培养中使用太昂贵。非动物来源组分的可选来源会有利于依赖细胞培养技术的产业。

[0167] 因此在一实施方案中本发明提供了用于培养细胞的方法,包括提供补充了两种或更多种蛋白的细胞培养基,所述蛋白选自乳铁蛋白、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白、 α -乳白蛋白以及其衍生物、部分和生物活性片段;以及将待培养细胞引入该细胞培养基。与在未加强的细胞培养基中生长的细胞相比,在该细胞培养基中生长的细胞表现出改善的生长特性。

[0168] 因此在一实施方案中本发明提供了用于培养细胞的方法,包括提供补充了两种或更多种蛋白的细胞培养基,所述蛋白选自乳铁蛋白、转铁蛋白、白蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白、 α -乳白蛋白以及其衍生物、部分和生物活性片段;以及将待培养细胞引入该细胞培养基。与在未加强的细胞培养基中生长的细胞相比,在该细胞培养基中生长的细胞表现出改善的生长特性。

[0169] 根据其他实施方案,在培养细胞的方法和本发明的补充物中所用的蛋白的组合提供了对细胞培养基中存在的细胞的生长和 / 或生产力的协同效应。还根据其他实施方案,可以在培养细胞的方法中使用的包含一种蛋白组合的补充物包括乳铁蛋白和白蛋白。

[0170] 在另一方面,补充物包含转铁蛋白相关蛋白和白蛋白的组合,其提供了对细胞生长和生产力的协同效应。

[0171] 本发明的另一方面包括用于实现培养细胞提高的生长速率和培养细胞更高的生产力的方法,将本发明的补充物加入细胞培养基。

[0172] 本发明的补充物在组织和细胞培养以及重组蛋白生产的广泛应用中 useful,在组织培养中,并且特别在应激反应中,其提供了在防止细胞凋亡和提高细胞的活力方面的显著改善。

[0173] 细胞凋亡涉及一系列导致特征性细胞形态和死亡的生化事件。这些变化包括诸如失去膜不对称性和附着的细胞膜变化,细胞出泡细胞皱缩,核断裂,染色质凝集和染色体 DNA 断裂。

[0174] 细胞凋亡的过程被多种范围的细胞信号控制,其可以起源于细胞外(外在诱导物)或细胞内(内在诱导物)。细胞外信号可以包括毒素、激素、生长因子、一氧化氮、细胞因子,其可以在组织培养基中不同程度地存在。这些信号可以正面(即触发)或负面(即阻遏、抑制或减弱)影响细胞凋亡,并且因此影响总体细胞的活力。许多细胞内组分,包括 ATP 含量、钙水平和许多凋亡和抗凋亡基因也帮助调节细胞凋亡。细胞可以启动细胞内凋亡信号应对应激,其可以带来细胞自杀。在组织培养中遇到的应激诱导剂包括例如诸如内毒素的与组织培养组分相关的毒素,和从塑料制品浸出重金属,转染试剂(例如 Lipofectamine 和类似的基于脂质的转染试剂),病毒转化,无血清培养相关的营养和生长因子缺乏,或者细胞分化流程与生物反应器中高密度培养相关的低氧和氧化应激,以及例如通过去污剂和电穿孔引起的膜损伤而增加的细胞内钙浓度。

[0175] 在细胞死亡的实际过程发生之前,凋亡信号必须克服作为看门人监视细胞凋亡途径激活的调节蛋白。在体内,该步骤允许过程停止,细胞不再需要死亡。在该步骤涉及几个蛋白,虽然调控的两个主要机制已确定并且包括与线粒体功能性相关和直接涉及通过接头蛋白转导信号的凋亡机制。

[0176] 在细胞培养条件下生长的细胞可能经历与常规组织培养过程相关的细胞应激,如上所述其可以触发凋亡信号并增加细胞对凋亡的敏感性。例如,无血清培养相关的营养缺乏、生物反应器中高密度生长相关的氧化应激、DNA 转染试剂相关的细胞毒性化合物的使用和低温保存相关的热应激可以使细胞易于进入凋亡。通过增强细胞幸免这样的信号的能力可以提高这些过程中的细胞的活力,通过阻止细胞投入细胞死亡,从而提高这些方法的成功和效用。

[0177] 最近已鉴定许多抑制细胞凋亡发生或减少细胞凋亡影响的真核细胞基因。这些基因中一些抑制细胞中胱天蛋白酶依赖性凋亡途径,并且事实上用抗凋亡基因转染细胞可以有利于延长在生物需求条件下生长的转染细胞的寿命和生产力(美国专利第 6,586,206 号;第 7,531,327 号;美国专利申请 US 2009/0170165;US2009/0181426)。

[0178] 此外在某些情况下已显示外源热休克蛋白的加入提高在各种条件下培养细胞的存活(Novoselova et al., J. Neurochem. 94597-606 (2005); Tidwell et al., Cell Stress

& Chap 9(1)88-90(2004);Guzhova et al., Cell Stress & Chap.3(1)67-77(1998); Hounenou et al., Cell Stress & Chap 1(3)161-166(1996);Johnson et al., In vitro Cell.Dev.Biol.,29A 807-812(1993)。

[0179] 本发明部分基于以下证明,当将特定混合物加入培养中生长的哺乳动物时,植物来源的重组细胞培养组分蛋白出人意料地增强细胞生长和活力。出人意料地,蛋白的一些组合提供了对细胞生长和生产力的协同效应,其提供了与使用单独蛋白相比意想不到的好处。具体来说,这样的包含植物来源重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白的补充物导致培养物活力提高,细胞存活延长,细胞生长速率提高和从组织培养生物反应器产生的重组蛋白的产量提高。因为补充物表现出意想不到的改善的活性和稳定性,其提供了与使用标准重组或纯化蛋白相比显著的改进。

[0180] 本申请公开的补充物有利于,例如,提高细胞的活力和加快培养中生长的细胞的生长速率。在一方面,本发明的补充物有利于改善或提高来自细胞培养的重组蛋白的产量。本发明提供的进一步改进如下详述。

[0181] 在一实施方案中,本发明包括用于促进所培养细胞生长的方法,其包含将补充物加入细胞培养基。

[0182] 在一实施方案中,本发明包括用于提高已适应无血清培养基的细胞的生产力的方法,其包含将补充物加入无血清培养基。

[0183] 在一实施方案中,本发明包括用于减少生物反应器中乳酸积累的方法,其包含将补充物加入生物反应器中所培养的细胞。

[0184] 在一实施方案中,本发明包括用于减少生物反应器中葡萄糖和其他糖的消耗的方法,其包含将补充物加入生物反应器中所培养的细胞。

[0185] 在一实施方案中,本发明包括减少在生物反应器中从培养开始到收获以产生蛋白所需的时间的方法,其包含将补充物加入生物反应器中所培养的细胞。

[0186] 在一实施方案中,本发明包括用于提高生物反应器中细胞的活力的方法,其包含将补充物加入生物反应器。

[0187] 在一实施方案中,本发明包括用于提高在无血清条件下生长的细胞的活力的方法,其包含将补充物加入无血清培养基。

[0188] 在一实施方案中,本发明包括用于在以低密度接种时提高细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基。

[0189] 在一实施方案中,本发明包括用于提高从单细胞克隆生长的细胞的活力的方法,其包含将补充物加入细胞培养基。

[0190] 在一实施方案中,本发明包括用于提高培养中生长的原代细胞的活力的方法,其包含将补充物加入培养基。

[0191] 在一实施方案中,本发明包括用于提高转染之后细胞的活力的方法,其包含在转染之前、期间或之后立即将补充物加入细胞培养基。

[0192] 在一实施方案中,本发明包括用于提高低温保存之后细胞的活力的方法,其包含在低温保存或解冻之前、期间或之后立即将补充物加入细胞培养基。

[0193] 在一实施方案中,本发明包括用于提高培养中生长的干细胞的生长速率或活力的方法,其包含将本发明的补充物加入细胞培养基。

[0194] 在一实施方案中,本发明包括用于提高从培养细胞产生的重组产物产量的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将本发明的补充物加入细胞培养基。

[0195] 在一实施方案中,本发明包括用于改善从培养细胞产生的重组产物的纯化的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将补充物加入培养基。

[0196] 在一实施方案中,本发明包括用于减少从培养细胞产生的重组产物的蛋白水解的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将补充物加入培养基。

[0197] 在一实施方案中,本发明包括用于提高从培养细胞产生的重组产物的生物活性的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将补充物加入培养基。

[0198] 在一实施方案中,本发明包括用于提高从培养细胞产生的重组产物的稳定性的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将补充物加入培养基。

[0199] 在一实施方案中,本发明包括用于改善从培养细胞产生的重组产物的装配的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将补充物加入培养基。

[0200] 在一实施方案中,本发明包括用于创造从培养细胞产生的重组产物的更具有人类模式糖基化的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将补充物加入培养基。

[0201] 在一实施方案中,本发明包括用于创造具有更少免疫原性的从培养细胞产生的重组产物的方法,其包含在培养的生长期、过渡期或生产期中的一个或多个时期将包含重组蛋白的补充物加入培养基。

[0202] 在任何这些方法中,通过增加培养中(和发酵期间)的宿主细胞的活力,本发明的补充物提供了简单而经济有效的方法以增加功能性重组蛋白的产量、和或纯度、生物活性、稳定性和装配。此外,通过减少或抑制细胞培养中的细胞凋亡,本发明的补充物可以减少培养基中不良蛋白酶的数量或存在并保护表达的所关注蛋白免受蛋白水解降解,从而增加产生的所关注蛋白的质量,如活性蛋白量增加和完整蛋白产量增加所证明的。此外,申请人发现本发明的补充物可以保护细胞对抗培养组分中存在的诸如去污剂、重金属和内毒素污染的化学剂的潜在不利影响,或者保护细胞对抗在转染或低温保存期间引入细胞的有毒试剂。

[0203] 在任何本发明的方法中,本发明的补充物可以在任何方便的时候直接加入或混合至培养基,例如更换培养基、传代细胞时,或者以低密度接种细胞时。任选地,在细胞培养过程的开始(在起始时,第0天)将补充物加入培养基。在一方面,可以在预期的应激事件之前加入本发明的补充物,例如在低温保存、转染或撤除血清等之前。

[0204] 在另一方面,细胞培养期间在出现典型的细胞凋亡诱导的时间点之前将补充物加入培养基。例如,在大规模细胞培养期间,在培养的约第3天或第4天可以观察到细胞凋亡诱导,因此,优选在第3天或第4天之前加入补充物。任选地,始终或者在细胞培养持续时间加入期望数量的补充物,例如,对于整个发酵在每天的基础上加入期望数量的补充物。作为实例,对于5天的培养,可以在第0天加入补充物,并且其后每24小时加入补充物直至培养终止。

[0205] 因此在一实施方案中,本发明提供了通过将本发明的补充物加入生物反应器来提高生物反应器中产生的重组蛋白的产量和质量的方法。在一实施方案中,所述生物反应器

包含细菌细胞。在另一方面所述生物反应器包含酵母细胞。在另一方面所述生物反应器包含植物细胞。在另一方面所述生物反应器包含哺乳动物细胞。

[0206] 在另一实施方案中,本发明提供了通过将本发明的补充物加入细胞培养物来提高细菌细胞中产生的重组蛋白的产量和质量的方法。在另一实施方案中,本发明提供了通过将本发明的补充物加入细胞培养物来提高酵母细胞中产生的重组蛋白的产量和质量的方法。在另一实施方案中,本发明提供了通过将本发明的补充物加入细胞培养物来提高植物细胞中产生的重组蛋白的产量和质量的方法。在另一实施方案中,本发明提供了通过将本发明的补充物加入细胞培养物来提高昆虫细胞中产生的重组蛋白的产量和质量的方法。在另一实施方案中,本发明提供了通过将本发明的补充物加入细胞培养物来提高哺乳动物细胞中产生的重组蛋白的产量和质量的方法。

[0207] 在另一实施方案中,本发明提供了通过在细胞培养系统的生产期之前或期间将本发明的补充物加入细胞培养系统来增加细胞培养系统生产期的产量并从而增加生物反应器生产力的方法。

[0208] 在该方法的一方面,生产期的产量增加约 10%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 20%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 30%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 40%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 50%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 60%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 70%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 80%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 90%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 100%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 200%。在该方法的一方面,生产期的产量增加约 500%。

[0209] 在任何这些方法的一方面,与不加入补充物的对照细胞培养系统相比产量增加。在任何这些方法的一方面,与加入缺少转铁蛋白相关蛋白或重组血清白蛋白的补充物的对照细胞培养系统相比产量增加。在一方面,当在相同培养条件下测量时,与单独加入重组白蛋白和转铁蛋白相关蛋白时的综合效果相比产量增加。

[0210] 在另一实施方案中,本发明提供了在与用于蛋白生产的正常生长条件相比升高的温度下生产所关注蛋白的方法,其包含将本发明的补充物加入表达所关注蛋白的细胞。

[0211] 在另一实施方案中,本发明提供了减少细胞培养表达系统中所关注的聚集倾向蛋白所形成的团聚体量的方法,其包含将本发明的补充物加入细胞培养表达系统,凭此减少蛋白的聚集状态。

[0212] 在另一实施方案中,本发明提供了通过阻止重组蛋白的变性和聚集来提高细胞表达的所关注蛋白活性的方法,其包含将本发明的补充物加入细胞,凭此提高所关注蛋白的特定活性。

[0213] 在另一实施方案中,本发明提供了提高有聚集倾向、引起沉淀发生或本身对细胞有毒的蛋白在细胞培养表达系统中的表达的方法,其包含将本发明的补充物加入细胞培养表达系统,凭此提高所关注蛋白的表达。

[0214] 在任何这些方法中加入的补充物量取决于各种因素,例如,宿主细胞类型、细胞密度、所关注蛋白和培养条件等。确定加入培养基的补充物的期望浓度在本领域技术之内,并且可以通过常规优化经验确定而不用过多的实验。

[0215] 技术人员会很容易理解不同细胞类型会对本发明的补充物具有不同程度的反应,

并且在一定程度上这会由补充物中的蛋白量或类型决定。此外,不同的细胞密度会需要对加入培养物的补充物的总量以及单独蛋白的浓度进行适当调整,以应对增加的细胞数量。此外,通过悬浮培养或贴壁培养生长的细胞会具有不同的可用于蛋白进入的膜表面积,并且通常会表现出不同的反应速率和程度。因此,应该选择提供足够的细胞凋亡抑制或者活力或净细胞生长提高的浓度。通常会加入本发明的补充物至终浓度为约 0.1%、约 0.5%、约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、约 25%、约 30%、约 40%或约 50% wt/wt 或 wt/ 体积。

[0216] 通常会有补充物浓度的上限范围,超过后不会出现细胞存活的进一步增加。如下文实施例所述,申请人发现当将本发明的补充物以约 200mg/L 至约 2g/L,或更优选约 200mg/L 至约 1000mg/L,或更优选约 250 至约 500mg/L 的浓度加入细胞培养物时,其可以抑制细胞凋亡。

[0217] II. 补充物

[0218] 根据本发明的细胞培养基、用于产生补充细胞培养基的方法和利用强化培养基培养细胞的方法可以包括来源于动物、植物、细菌、酵母和昆虫来源的组分。根据本发明的一方面,该组分来源于植物来源,并且优选来自单子叶植物。该组分可以与诸如 NaCl、KCl、 NaH_2PO_4 、 NaHCO_3 、 CaCl_2 和 MgCl_2 的无机盐以及诸如氨基酸、维生素、生长因子、糖和抗生素的其他成分组合以形成各种不同细胞培养基。

[0219] 根据其他实施方案,细胞培养基中所含有的蛋白为重组蛋白,优选重组人蛋白。还根据其他实施方案,细胞培养基中的一种或多种蛋白为植物产生的异源蛋白,优选细胞培养基中的两种或更多种蛋白为植物产生的异源蛋白,并且更优选细胞培养基中的所有蛋白为植物产生的异源蛋白。

[0220] 根据另一方面,所述蛋白的一种为白蛋白,并且至少一种额外的蛋白是选自生长因子、乳铁蛋白、转铁蛋白、胰岛素、生长激素、纤连蛋白附着因子、核纤层蛋白附着因子、胶原酶、血小板源性生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、胸腺因子、haptocorin、乳粘素、乳过氧化物酶、甲胎蛋白、免疫球蛋白、 α -乳白蛋白以及其衍生物、部分和生物活性片段。

[0221] 根据其他实施方案,在产生补充细胞培养基的方法中所用的蛋白组合提供了对细胞培养基中存在的细胞的生长和 / 或生产力的协同效应。还根据其他实施方案,可以在产生细胞培养基的方法中使用的一种蛋白组合包括白蛋白与至少一种选自乳铁蛋白、转铁蛋白、黑素转铁蛋白和卵转铁蛋白 (ovotransferin) 的其他蛋白的组合。

[0222] 在一方面,本发明的补充物包含植物来源的重组人血清白蛋白。

[0223] 术语“白蛋白”指所有天然存在和合成形式的白蛋白。优选地,术语“白蛋白”指重组白蛋白。在一方面,白蛋白来自脊椎动物。在一方面,白蛋白来自哺乳动物。在另一实施方案中,白蛋白是人的。在另一方面,重组白蛋白是从植物细胞产生的。在一特别优选的实施方案中,重组白蛋白是从转基因水稻 (*Oryza sativa*) 产生的。代表性物种和不同物种白蛋白的 Gene bank 登录号如下文表 D1 所列。

表 D1
示例性白蛋白基因

[0224]	物种	Gene Bank 登录号
	人	NP_000468.1
	黑猩猩	XP_517233.2
	家犬	XP_855557.1
	牛	NP_851335.1
	小家鼠	NP_033784.1
	褐家鼠	NP_599153.1
	原鸡	NP_990592.1

[0225] 应该理解对于在不同物种中的白蛋白重组生产,通常会需要为了所关注的宿主生物而密码子优化基因的核酸序列。这样的密码子优化可以通过对所关注的宿主生物的优选密码子使用的标准分析和通过标准 DNA 合成的优化核酸的合成来完成。许多公司提供这样的服务,在服务的基础上收费,并且包括例如 DNA2.0 (CA, USA) 和 Operon Technologies. (CA, USA)。

[0226] 白蛋白可以为其天然形式,即如在自然中出现的不同等位变体,例如,通过截短(例如,从 N- 或 C- 端或者两端)或其他氨基酸缺失、添加、插入、取代或者翻译后修饰,其氨基酸序列可以不同。白蛋白的包括翻译后修饰在内的天然存在的化学修饰和降解产物也特别包括在本发明的任何方法中,其包括例如,白蛋白的焦谷氨酰胺、异天冬氨酰胺、蛋白水解、磷酸化、糖基化、还原、氧化、异构化和脱氨基变体。

[0227] 天然或合成的白蛋白序列的片段也可以具有其源自的肽的理想功能特性,并且可以用于本发明的任何方法。因此如本文所用的术语“片段”包括所提供的白蛋白片段,该片段保留了整个分子的生物或治疗有益活性。

[0228] 例如,白蛋白含有至少 2 个高亲和力的多金属结合位点,结合许多生理上重要的金属离子,包括铜、锌、镉和镍。(Carter et al., Advances in Protein Chemistry 45153-203(1994); Bai et al., J. Inorg Biochem 70(1)33-39(1998), Blindauer et al., J. Biol. Chem. 284(34)23116-24(2009); 美国专利第 6,787,636 号)。因为痕量的这些金属通常存在于白蛋白的重组生产中,大量的这些金属离子可以螯合至蛋白。这些离子的结合,并且尤其是镉和镍结合至重组白蛋白与该蛋白作为组织培养组分加入细胞时的细胞毒性有关。

[0229] 因此,在一方面,本发明的白蛋白可以包含白蛋白的片段,其包括白蛋白的多金属结合位点所包含的一个或多个氨基酸的缺失。在一方面,白蛋白片段是通过成熟蛋白 N 端的一个或多个氨基酸的缺失所产生的。在另一方面,该白蛋白可以包含白蛋白的 N 端金属结合位点所包含的任何氨基酸的一个或多个缺失或突变。在一方面,待缺失或突变的氨基酸独立地选自成熟蛋白的最初 10 个氨基酸。

[0230] 因此如本文所用的术语“衍生物”指与天然序列相比具有修饰的白蛋白序列或其片段。这样的修饰可以为一个或多个氨基酸缺失、添加、插入和 / 或取代。这些可以为相邻或不相邻的。代表性变体可以包括与表 D1 所列的任何基因相比具有 1-20, 或者更优选 1-15、1-10 或 1-5 个氨基酸取代、插入和 / 或缺失的变体。取代的氨基酸可以为任何氨基酸,

特别是众所周知的 20 种传统氨基酸中的一种 (Ala(A) ;Cys(C) ;Asp(D) ;Glu(E) ;Phe(F) ;Gly(G) ;His(H) ;Ile(I) ;Lys(K) ;Leu(L) ;Met(M) ;Asn(N) ;Pro(P) ;Gln(Q) ;Arg(R) ;Ser(S) ;Thr(T) ;Val(V) ;Trp(W) ;和 Tyr(Y))。任何这样的白蛋白变体或衍生物可以用于本发明的任何方法。

[0231] 因此,本发明的白蛋白可以包含在任何白蛋白功能结合结构域中的氨基酸缺失、插入或突变。在一方面,白蛋白可以包含白蛋白结合结构域中的突变。在一方面,突变的结合结构域为如美国专利第 5,780,593 号所述的涉及结合阿司匹林、华法林、地西洋、洋地黄毒苷、氯贝丁酯 (dlofibrate)、布洛芬或 AZT 的结构域,或者如 Blindauer et al., J.Biol. Chem. 284(34)23116-24(2009) 所述的多金属结合位点。

[0232] 因此,可以用于本发明的任何方法的白蛋白可以具有与天然白蛋白氨基酸序列基本上同源或基本上相似的氨基酸序列,例如与表 D1 所列的任何天然白蛋白基因序列基本上同源或基本上相似。可选地,白蛋白可以具有与表 D1 所列的白蛋白具有至少 30%,优选至少 40、50、60、70、75、80、85、90、95、98 或 99% 相同性的氨基酸序列。在一优选实施方案中,用于本发明的任何方法的白蛋白与如下文下划线所示的成熟分泌人血清白蛋白 (SEQ. ID. No. 1) (Swiss-Prot P02768) 至少 80% 相同。

[0233] MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQCPF

[0234] EDHVKLNVNEV TEFAKTCVAD ESAENCCKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP

[0235] ERNECFLQHK DDNPNLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF

[0236] FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDELRL DEGKASSAKQ RLKCAASLQKF GERAFAKAWAV

[0237] ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTKVHTECC HGDILLECADD RADLAKYICE NQDSISSKLL

[0238] ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYEYAR

[0239] RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIKQNCLEFE

[0240] QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV

[0241] LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL

[0242] SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCKKADDKET CFAEEGKKLV

[0243] AASQAALGL

[0244] 还包括白蛋白与其他蛋白的融合蛋白,并且这些融合蛋白可以提高活性、靶向、稳定性或效价。

[0245] 保留或稳定白蛋白活性或生物半衰期的天然白蛋白结构的化学修饰也可以与本文所述的任何方法一起使用。这样的化学修饰策略包括但不限于聚乙二醇化、糖基化和酰化 (参见 Clark et al. :J. Biol. Chem. 271(36) :21969-21977, 1996 ;Roberts et al. : Adv. Drug. Deliv. Rev. 54(4) :459-476, (2002) ;Felix et al. :Int. J. Pept. Protein. Res. 46(3-4) :253-264, (1995) ;Garber Diabetes Obes. Metab. 7(6)666-74(2005))。还可以包括 C 端和 N 端保护基团和 peptomimetic 单元。

[0246] 天然 L-氨基酸的异构体,例如 D-氨基酸可以并入白蛋白的任何上述形式,并且用于本发明的任何方法。所有这样的白蛋白变体、衍生物、融合蛋白或片段包括在内,可以用于本文所要求保护或公开的任何方法,并且纳入在术语“白蛋白”下。

[0247] 在本发明的补充物的一方面,白蛋白为植物中产生的重组人血清白蛋白。在另一方面,白蛋白包含少于约 2% 的聚集白蛋白。在另一方面,白蛋白包含少于约 1% 的聚集白

蛋白。

[0248] 在一实施方案中,本发明的补充物包含共纯化的重组白蛋白和水稻 hsp 的制品,其也基本上无去污剂和内毒素,否则会掩盖或抑制 hsp 的积极影响。在一方面,本发明的补充物具有少于约 1EU 内毒素,并且白蛋白为至少约 95% 纯。在另一方面,本发明的补充物包含结合至热休克蛋白的重组白蛋白的组合物。在另一方面,本发明的补充物包含重组白蛋白和水稻 hsp70 同系物。在一方面,水稻 hsp70 同系物选自 HSP70、Bip 和水稻基质蛋白。

[0249] 如本文所用的术语“热休克蛋白”、“HSP”或“hsp”包括保留了抗凋亡活性的热休克蛋白超家族的所有天然存在和合成的形式。这样的热休克蛋白包括小热休克蛋白 /HSPB 家族、Hsp40/DnaJ 家族、HSP70/HSPA 家族、HSP90/HSPC 家族、HSP110/HSPH 家族和分子伴侣 (chaperone) 家族,以及由其衍生的两种或更多种热休克蛋白或核苷酸交换因子的肽片段和蛋白复合物 (例如, HSP70 和 HSP40 的复合物)。热休克蛋白可以为天然形式,即如自然界中在不同物种中出现的可以视为功能相当变体的不同变体,或者可以为功能相当的天然衍生物,例如,通过截短 (例如,从 N 端或 C 端或者两端) 或其他氨基酸缺失、添加、插入、取代或者翻译后修饰,其氨基酸序列可以不同。HSP 的包括翻译后修饰在内的天然存在的化学衍生物和降解产物也特别包括在本发明的任何方法中,其包括例如, HSP 的焦谷氨酰胺、异天冬氨酰胺、蛋白水解、磷酸化、糖基化、氧化、异构化和脱氨基变体。

[0250] 术语“转铁蛋白相关蛋白”指转铁蛋白家族蛋白,包括转铁蛋白、乳铁蛋白、黑素转铁蛋白和卵转铁蛋白。迄今为止已解出的横跨所有物种的转铁蛋白家族成员的晶体结构表现出高度的结构相似性,这并不出人意料,因为转铁蛋白、乳铁蛋白和卵转铁蛋白享有 60-80% 序列相同性。(Wally and Buchanan, *Biometals* (2007) 20249-262)。所有转铁蛋白相关蛋白含有两个约 340 个残基的结构域,其被认为从古老的复制事件进化而来。对于血清转铁蛋白、卵转铁蛋白和乳铁蛋白,每个重复叶结合一个 Fe(III) 原子和一个碳酸根阴离子。除了少数显著的例外,每个铁原子协调至 4 个保守氨基酸残基:一个天冬氨酸、两个酪氨酸和一个组氨酸,而阴离子结合与非常靠近的精氨酸和苏氨酸相关。(Anderson et al., (1989) *J. Mol. Biol.* 209 711-734)。

[0251] 人转铁蛋白和乳铁蛋白享有超过 61% 的序列相同性,并且具有相似的三维结构。转铁蛋白在血液中通过拾取游离铁离子并将其递送至细胞来在受体介导的内吞作用中转运铁,其中 TF- 受体复合物被内化,铁被释放至内体,并且复合物被回收至细胞表面,在那里释放 TF。相比之下,已知乳铁蛋白或卵转铁蛋白的非铁转运作用。通过比较,认为这些蛋白通过整合所有可用的铁来发挥功能以阻止入侵的细菌获得铁。人转铁蛋白在比人乳铁蛋白更高的 pH 下释放铁,这可能与转铁蛋白在内吞作用之后释放铁入内体的需要和乳铁蛋白在诸如胃的低 pH 环境下保持铁的需要有关 (Baker & Backer (2004) *Biometals* 17 209-216)。

[0252] 术语“转铁蛋白”指所有天然存在和合成形式的转铁蛋白。在一方面,术语“转铁蛋白”指重组转铁蛋白。在一方面,术语“转铁蛋白”指血浆来源的转铁蛋白。在一方面,转铁蛋白来自脊椎动物。在一方面,转铁蛋白来自哺乳动物。在另一实施方案中,转铁蛋白是人的。在另一方面,重组转铁蛋白是从植物细胞产生的。在一特别优选的实施方案中,重组转铁蛋白是从转基因水稻 (*Oryza sativa*) 产生的。代表性物种和不同物种转铁蛋白的 Gene bank 登录号下文表 D2 所列。

表 D2
示例性转铁蛋白基因

[0253]

物种	Gene Bank 登录号
人	NP_001054.1
家犬	XP_864550.1

[0254]

牛	NP_803450.2
小家鼠	NP_598738.1
褐家鼠	NP_001013128.1
原鸡	NP_990635.1
斑马鱼	NP_001015057.1

[0255] 转铁蛋白可以为其天然形式,即如其在自然中出现的不同脱辅基形式或等位变体,例如,通过截短(例如,从N端或C端或者两端)或其他氨基酸缺失、添加、插入、取代或者翻译后修饰,其氨基酸序列可以不同。转铁蛋白的包括翻译后修饰在内的天然存在的化学修饰和降解产物也特别包括在本发明的任何方法之内,其包括例如,转铁蛋白的焦谷氨酰、异天冬氨酰、蛋白水解、磷酸化、糖基化、还原、氧化、异构化和脱氨基变体。

[0256] 可以在本发明的任何方法中使用的转铁蛋白可以具有与天然转铁蛋白氨基酸序列基本上同源或基本上相似的氨基酸序列,例如与表 D2 所列的任何天然转铁蛋白基因序列基本上同源或基本上相似。可选地,转铁蛋白可以具有与表 D2 所列的转铁蛋白具有至少 30%,优选至少 40、50、60、70、75、80、85、90、95、98 或 99% 相同性的氨基酸序列。在一优选实施方案中,用于本发明的任何方法的转铁蛋白与成熟人转铁蛋白至少 80% 相同。

[0257] 术语“乳铁蛋白”指所有天然存在和合成形式的乳铁蛋白。在一方面,术语“乳铁蛋白”指重组乳铁蛋白。在一方面,术语“乳铁蛋白”指乳源性乳铁蛋白。在一方面,乳铁蛋白来自脊椎动物。在一方面,乳铁蛋白来自哺乳动物。在另一实施方案中,乳铁蛋白是人的。在另一方面,重组乳铁蛋白是从植物细胞产生的。在一特别优选的实施方案中,重组乳铁蛋白是从转基因水稻 (*Oryza sativa*) 产生的。代表性物种和不同物种乳铁蛋白的 Gene bank 登录号如下文表 D3 所列。

表 D3
示例性乳铁蛋白基因

[0258]

物种	Gene Bank 登录号
人	AAA59511.1
野猪	AAA31059.1
单峰驼	CAB53387.1
牛	AAA30610.1
马	CAA09407.1

[0259] 乳铁蛋白可以为其天然形式,即如其在自然中出现的不同脱辅基形式或等位变体,例如,通过截短(例如,从N端或C端或者两端)或其他氨基酸缺失、添加、插入、取代或者翻译后修饰,其氨基酸序列可以不同。乳铁蛋白的包括翻译后修饰在内的天然存在的化学修饰和降解产物也特别包括在本发明的任何方法中,其包括例如,乳铁蛋白的焦谷氨酰、

异天冬氨酰、蛋白水解、磷酸化、糖基化、还原、氧化、异构化和脱氨基变体。可以在本发明的任何方法中使用的乳铁蛋白可以具有与天然乳铁蛋白氨基酸序列基本上同源或基本上相似的氨基酸序列,例如,与表 D3 所列的任何天然乳铁蛋白基因序列基本上同源或基本上相似。可选地,乳铁蛋白可以具有与表 D3 所列的乳铁蛋白具有至少 30%,优选至少 40、50、60、70、75、80、85、90、95、98 或 99% 相同性的氨基酸序列。在一优选实施方案中,用于本发明的任何方法的乳铁蛋白与成熟人乳铁蛋白至少 80% 相同。

[0260] 术语“黑素转铁蛋白”指所有天然存在和合成形式的黑素转铁蛋白。在一方面,术语“黑素转铁蛋白”指重组黑素转铁蛋白。在一方面,术语“黑素转铁蛋白”指从细胞或组织纯化的黑素转铁蛋白。在一方面,黑素转铁蛋白来自脊椎动物。在一方面,黑素转铁蛋白来自哺乳动物。在另一实施方案中,黑素转铁蛋白是人的。在另一方面,重组黑素转铁蛋白是从植物细胞产生的。在一特别优选的实施方案中,重组黑素转铁蛋白是从转基因水稻 (*Oryza sativa*) 产生的。代表性物种和不同物种黑素转铁蛋白的 Gene bank 登录号如下文表 D4 所列。

[0261]

表 D4 示例性黑素转铁蛋白基因	
物种	Gene Bank 登录号
人	AAA59992.1
穴兔	NP_001075461.1
小家鼠	NP_038928.1
家犬	XP_545158.2
原鸡	CAA63003.1

[0262] 术语“卵转铁蛋白”指所有天然存在和合成形式的卵转铁蛋白。在一方面,术语“卵转铁蛋白”指重组卵转铁蛋白。在一方面,卵转铁蛋白来自脊椎动物。在一方面,卵转铁蛋白来自禽类。在另一方面,重组卵转铁蛋白是从植物细胞产生的。在一特别优选的实施方案中,重组卵转铁蛋白是从转基因水稻 (*Oryza sativa*) 产生的。代表性物种和不同物种卵转铁蛋白的 Gene bank 登录号包括 CAA26040.1。

[0263] 术语“胰岛素相关生长因子”或“IGF-1”指所有天然存在和合成形式的胰岛素相关生长因子,包括 IGF-1、IGF-1A、IGF-1B、IGF-2A 和 IGF-2B。在一方面,术语“胰岛素相关生长因子”指重组胰岛素相关生长因子。在一方面,术语“胰岛素相关生长因子”指从细胞或组织纯化的胰岛素相关生长因子。在一方面,胰岛素相关生长因子来自脊椎动物。在一方面,胰岛素相关生长因子来自哺乳动物。在另一实施方案中,胰岛素相关生长因子是人的。在另一方面,重组胰岛素相关生长因子是从植物细胞产生的。在一特别优选的实施方案中,重组胰岛素相关生长因子是从转基因水稻 (*Oryza sativa*) 产生的。代表性物种和不同物种胰岛素相关生长因子的 Gene bank 登录号如下文表 D5 所列。

[0264]

表 D5 示例性胰岛素相关生长因子基因	
物种	Gene Bank 登录号
人	P01343 P05019 CAA01954.1 CAA40093.1 CAA40092.1
牛	NP_001071296
小家鼠	NP_001104746.1 NP_034642.2 NP_908941.1 NP_001104745.1 NP_001104744.1
非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	Q90WW4
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	NP_571900

[0265] 胰岛素相关生长因子可以为其天然形式,即如其在自然中出现的不同脱辅基形式或等位变体,例如,通过截短(例如,从N端或C端或者两端)或其他氨基酸缺失、添加、插入、取代或者翻译后修饰,其氨基酸序列可以不同。胰岛素相关生长因子的包括翻译后修饰在内的天然存在的化学修饰和降解产物也特别包括在本发明的任何方法中,其包括例如,胰岛素相关生长因子的焦谷氨酰、异天冬氨酰、蛋白水解、磷酸化、糖基化、还原、氧化、异构化和脱氨基变体。可以在本发明的任何方法中使用的胰岛素相关生长因子可以具有与天然胰岛素相关生长因子氨基酸序列基本上同源或基本上相似的氨基酸序列,例如,与表D5所列的任何天然胰岛素相关生长因子基因序列基本上同源或基本上相似。可选地,胰岛素相关生长因子可以具有与表D5所列的胰岛素相关生长因子具有至少30%,优选至少40、50、60、70、75、80、85、90、95、98或99%相同性的氨基酸序列。在一优选的实施方案中,用于本发明的任何方法的胰岛素相关生长因子与成熟人胰岛素相关生长因子至少80%相同。

[0266] 在一方面,所述补充物包含以约1比5、约1比10、约1比15、约1比20或约1比25的乳铁蛋白与白蛋白比例混合的乳铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中乳铁蛋白的浓度为约0.1至约0.5g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少30%。

[0267] 在一方面,所述补充物包含以约1比1、约1比2、约1比3、约1比4或约1比5的乳铁蛋白与白蛋白比例混合的乳铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中乳铁蛋白的浓度为约0.5至0.8g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少30%。

[0268] 在一方面,所述补充物包含以约1比0.5、约1比0.75、约1比1.0、约1比1.25、

约 1 比 1.5、约 1 比 1.75 或约 1 比 2.0 的乳铁蛋白与白蛋白比例混合的乳铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中乳铁蛋白的浓度为约 0.8 至 1.5g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 30%。

[0269] 在一方面,所述补充物包含以约 1 比 0.25、约 1 比 0.33、约 1 比 0.66、约 1 比 1.00、约 1 比 1.33、约 1 比 1.66 和约 1 比 2.0 的乳铁蛋白与白蛋白比例混合的乳铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中乳铁蛋白的浓度为约 1.0 至约 1.5g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 30%。

[0270] 在一方面,所述补充物包含以约 1 比 0.8、约 1 比 1 或约 1 比 1.2 的乳铁蛋白与白蛋白比例混合的乳铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中乳铁蛋白的浓度为约 0.1 至约 1.5g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 50%。

[0271] 在一方面,所述补充物包含以约 1 比 20、约 1 比 100 或约 1 比 200 的转铁蛋白与白蛋白的比例混合的转铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中转铁蛋白的浓度为约 1 至约 10 μ g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 50%。

[0272] 在一方面,所述组合物包含以约 1 比 500、约 1 比 1000 或约 1 比 2000 的转铁蛋白与白蛋白的比例混合的转铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中转铁蛋白的浓度为约 1 至约 10 μ g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 50%。

[0273] 在一方面,所述补充物包含以约 1 比 3000、约 1 比 4000 或约 1 比 5000 的转铁蛋白与白蛋白的比例混合的转铁蛋白和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中转铁蛋白的浓度为约 1 至约 10 μ g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 50%。

[0274] 在一方面,所述补充物包含以约 1 比 80、约 1 比 100 或约 1 比 120 的转铁蛋白与白蛋白的比例混合的转铁蛋白和白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中转铁蛋白的浓度为约 3 至约 8 μ g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 80%。

[0275] 在一方面,所述补充物包含以约 1 比 100000、约 1 比 10000 或约 1 比 1000 的 IGF-1 与白蛋白的比例混合的 IGF-1 和重组白蛋白的混合物。在任何这些补充物的一方面,培养物中 IGF-1 的浓度为约 1 至约 10 μ g/L。在一方面,当以相同浓度加入培养物并在相同培养条件下测量时,与单独每种细胞培养组分的累加效应相比,作为组织培养组分的组合的补充物显示生产力增加至少 50%。

[0276] 在本发明的另一方面,所述补充物含有选自生长因子、硒酸钠和乙醇胺的一种或多种附加因子。

[0277] 在本发明的另一方面,生长因子独立地选自胰岛素、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子 1-23(FGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF)、角质形成细胞生长因子 1 和 2(KGF)和白血病抑制因子(LIF)。在一方面,生长因子为胰岛素。在另一方面,生长因子为转铁蛋白。

[0278] 在一方面,本发明的补充物可以通过在水溶液中混合分离的细胞培养组分来制备。

[0279] 已知浓度的含有一种组分部分 A(白蛋白或另一细胞培养组分)的液体也可以与含有部分 B(例如转铁蛋白相关蛋白或 IGF-1)组合以获得含有期望比例组分的比例。可以将粉末、冻干或以其他方式干燥的粉末(白蛋白)直接加入含有细胞培养组分(例如转铁蛋白相关蛋白)的水溶液,以便获得基于白蛋白干重的关于其他细胞培养组分的在任何期望范围的比例。粉状、冻干或以其他方式干燥的白蛋白还可以与细胞培养组分粉末在质量比质量的基础上混合以获得完全基于重量的比例。所得的粉末可以在从非常低(皮摩尔)到非常高浓度(毫摩尔)范围的浓度溶于本领域常见的合适的缓冲液以重组细胞培养组分。

[0280] 在一方面,本发明的补充物因此会包含重组白蛋白和一种或多种转铁蛋白相关蛋白和/或 IGF-1。这样的补充物通常会制备为无菌液体或粉末形式。组合中转铁蛋白相关蛋白的总量可以从细胞培养组分重量的 50%至约 0.0001%变化。在另一方面,组合中转铁蛋白相关蛋白的量可以从约 0.01%至约 0.02%、或约 0.01%至约 0.09%、或约 0.02%至约 0.04%、或约 0.02%至约 0.06%、或约 0.02%至约 0.08%变化。在另一方面,与白蛋白相比,组合中转铁蛋白相关蛋白的量大于约 0.01%,或更优选大于约 0.05%,或更优选大于约 0.1% wt/wt,或更优选大于约 0.2% wt/wt 的转铁蛋白相关蛋白。

[0281] 在任何本发明的补充物的一方面,重组白蛋白基本上无内毒素和去污剂。在另一方面,白蛋白具有少于约 1EU/mg 内毒素。在另一方面,白蛋白含有少于约 10ppm 去污剂。在任何要求包含的补充物的另一方面,白蛋白具有大于 95%的纯度。

[0282] 在任何本发明的补充物的另一方面,所述补充物包含结合至水稻热休克蛋白的重组白蛋白,其中该复合物具有少于约 1EU 内毒素并且关于白蛋白至少 95%纯。在一方面,重组白蛋白是在水稻中产生的。

[0283] 在任何这些方法的另一方面,所述补充物含有作为细胞培养组分的重组白蛋白,并且白蛋白基本上无聚集白蛋白。在任何这些补充物的另一方面,重组白蛋白具有少于约 2%的聚集白蛋白。

[0284] 在一方面,本发明的补充物因此会包含重组白蛋白与一种或多种结合的 hsp。这样的补充物通常会制备为无菌液体或粉末形式。白蛋白组合中 hsp 的总量可以从白蛋白重量的 5%至约 0.001%变化。在另一方面,白蛋白组合中 hsp 的量可以从约 0.01%至约 0.02%、或约 0.01%至约 0.09%、或约 0.02%至约 0.04%、或约 0.02%至约 0.06%、或约 0.02%至约 0.08%变化。在另一方面,白蛋白组合中 hsp 的量为, hsp 与白蛋白相比大于约 0.02%,或更优选大于约 0.03%,或更优选大于约 0.04% wt/wt,或更优选大于约 0.05% wt/wt。

[0285] III. 细胞培养基组分的产生

[0286] 用于本发明的补充物的白蛋白和转铁蛋白相关蛋白以及其他细胞培养基组分可以通过任何合适的方式制备,例如通过从天然存在的来源、从包含表达系统的遗传工程宿主细胞分离(参见下文),或者通过化学合成,利用例如肽自动合成仪,或者这样的方法的任何组合。用于制备这样的多肽的方法为本领域众所周知。

[0287] 为了重组生产,可以转基因宿主细胞以并入编码细胞培养基组分的核酸。为了在所选表达系统中高水平表达,通常会密码子优化该核酸,并且并入表达载体以使得能够在宿主细胞中表达所关注蛋白。载体可以环状、双链 DNA 存在,并且大小范围从几千碱基(kb)至数百 kb。优选的克隆载体从天然存在的质粒改造以促进多核苷酸序列的克隆和重组操作。许多这样的载体为本领域众所周知并且可商购;参见例如,Sambrook(In. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)), Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563-608(1980)。

[0288] 用于从植物细胞产生蛋白的一般和具体技术可以从下述专利和申请获得,每个整体援引并入本文:美国专利公开文本 No. 2003/0172403A1("Plant Transcription Factors and Enhanced Gene Expression");美国专利 No. 6,991,824("Expression of Human Milk Proteins in Transgenic Plants");美国专利公开文本 No. 2003/0221223("Human Blood Proteins Expressed in Monocot Seeds");美国专利公开文本 No. 2004-0078851("Production of Human Growth Factors in Monocot Seeds");美国专利公开文本 No. 2004/0063617("Method of Making an Anti-infective Composition for Treating Oral Infections");和国际申请 PCT/US2004/041083("High-level Expression of Fusion Polypeptides in Plant Seeds Utilizing Seed-Storage Proteins as Fusion Carriers")。其他用于从植物细胞产生蛋白的一般和具体技术可以从例如下述文献获得,每个整体援引并入本文:美国专利第 5,693,507 号、美国专利第 5,932,479 号、美国专利第 6,642,053 号和第 6,680,426 号(每个题目为"Genetic Engineering of Plant Chloroplasts");美国专利公开文本 No. 2005/0066384("Site-Targeted Transformation Using Amplification Vectors");美国专利公开文本 No. 2005/0221323("Amplification Vectors Based on Trans-Splicing");美国专利公开文本 No. 2006/0026718("Method of Controlling Cellular Processes in Plants");和美国专利公开文本 No. 2006/0075524(Method of Controlling A Cellular Process in a Multi-Cellular Organism);Marillonnet et al., Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants, Nature Biotech. (2005) 23(6):718-723。

[0289] 表达载体包括质粒、游离体、粘粒、逆转录病毒或噬菌体;表达载体可以用于表达编码细胞培养基组分的 DNA 序列,并且在一方面包含表达控制序列的装配。启动子和其他调控元件的选择可以根据预期的宿主细胞变化,许多这样的元件可商购,并且可以很容易地从诸如来自 Invitrogen(CA, USA) 的 Gateway 系统的分离组件装配。用于细胞培养基组分的表达系统可以为稳定或瞬时表达系统。

[0290] 代表性商购病毒表达载体包括但不限于,基于腺病毒的系统,例如可从 Crucell, Inc. 获得的 Per. C6 系统;基于慢病毒的系统,例如来自 Invitrogen 的 pLP1;和逆转录病毒载体,例如基于烟草花叶病毒的载体 (Lindbo et al., BMC Biotechnol. (2007) 7:52-58)。

[0291] 游离型表达载体能够在宿主细胞中复制,并且在适当的选择压力存在下在宿主细胞内作为染色体外游离体持续存在。(参见例如, Conese et al., Gene Therapy 11:1735-1742 (2004))。代表性商购游离型表达载体包括但不限于利用 EB 病毒核抗原 1 (EBNA1) 和 EB 病毒 (EBV) 复制起点 (oriP) 的游离型质粒,具体实例包括来自 Invitrogen 的载体 pREP4、pCEP4、pREP7。基于 EBV 的载体的宿主范围通过 EBNA1 结合蛋白 2 (EPB2) 共表达可以增加至几乎任何真核细胞类型 (Kapoor et al., EMBO J. 20:222-230 (2001)), 来自 Invitrogen 的载体 pcDNA3.1 和来自 Stratagene 的 pBK-CMV 代表用 T- 抗原和 SV40 复制起点代替 EBNA1 和 oriP 的游离型载体的非限制性实例。

[0292] 整合型表达载体可以随机整合入宿主细胞的 DNA, 或者可以包括重组位点以使表达载体和宿主细胞染色体之间能够特异性重组。这样的整合型表达载体可以利用宿主细胞染色体的内源表达控制序列来影响期望蛋白的表达。以位点特异性方式整合的载体的实例包括,例如,来自 Invitrogen 的 flp-in 系统 (例如, pcDNATM5/FRT) 或 cre-lox 系统的组件, 如在来自 Stratagene 的 pExchange-6 核心载体中可以发现的。以随机方式整合入宿主细胞染色体的载体的实例包括,例如,来自 Invitrogen 的 pcDNA3.1 (在没有 T- 抗原时引入), 来自 Promega 的 pCI 或 pFN10A (ACT) Flexi[®]。

[0293] 可选地,表达载体可以用于将强启动子或增强子序列引入和整合入细胞中的基因座,以便调节所关注内源基因的表达 (Capecchi MR. Nat Rev Genet. (2005) ;6(6) :507-12; Schindehutte et al., Stem Cells (2005) ;23(1) :10-5)。这个方法还可以用于将诸如 Tet-On 启动子 (美国专利 5,464,758 和 5,814,618) 的诱导型启动子插入细胞的基因组 DNA, 以便提供所关注内源基因的诱导型表达。激活构建体还可以包括导向序列以使激活序列能够同源或非同源重组入对所关注基因特异性的期望基因座 (参见例如, Garcia-Otin & Guillou, Front Biosci. (2006) 11:1108-36)。可选地,诸如 Cre-ER 的诱导重组酶系统可以用于在 4- 羟基他莫昔芬的存在下激活转基因 (Indra et al. Nuc. Acid. Res. (1999) 27(22) :4324-4327; Nuc. Acid. Res. (2000) 28(23) :e99; 和美国专利第 7,112,715 号)。

[0294] 用于产生细胞培养基组分的合适的细胞包括原核细胞、酵母、昆虫细胞、植物表达系统和哺乳动物表达系统。在这些总方针之内,有用的微生物宿主包括但不限于,来自芽孢杆菌、埃希氏菌属 (例如 E. coli)、假单胞菌属、链霉菌属、沙门氏菌属、欧文氏菌属的细菌,枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis), 短芽孢杆菌 (Bacillus brevis), 大肠杆菌 (Escherichia coli) 的各种菌株 (例如, HB 101 (ATCC NO. 33694)、DH5 α 、DH10 和 MC1061 (ATCC NO. 53338))。

[0295] 许多酵母菌株为本领域技术人员已知并且也可以用作细胞培养基组分表达的宿主细胞,其包括来自汉逊酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、鼻孢子菌属、酵母属和裂殖酵母属的酵母菌株,以及其他真菌。优选的酵母细胞包括,例如,酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 和毕赤酵母 (Pichia pastoris)。

[0296] 此外,在期望时,可以利用昆虫细胞系统产生用于本发明的补充物和方法的细胞培养基组分。这样的系统例如 Kitts et al., Biotechniques, 14:810-817 (1993);

Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572(1993); 和 Lucklow et al. (J. Virol., 67: 4566-4579(1993) 所述。优选的昆虫细胞包括 Sf-9 和 HI5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)。

[0297] 许多合适的植物表达系统可以用于细胞培养基组分的表达, 实例包括例如, 任何单子叶植物或双子叶植物。合适的单子叶植物包括但不限于, 水稻、大麦、小麦、黑麦、玉米、小米、小黑麦或高粱, 优选水稻。其他合适的植物包括拟南芥、苜蓿、烟草、花生和大豆。

[0298] 一般, 在植物中使用的表达载体包括下述构成嵌合基因的可操作地连接的元件: 来源于编码植物蛋白的基因的启动子, 可操作地连接至编码细胞培养基组分的基因。选择启动区, 以允许在种子成熟条件下诱导的方式受调控。用于本发明的启动子通常来源于谷类, 例如水稻、大麦、小麦、燕麦、黑麦、玉米、小米、小黑麦或高粱。

[0299] 在一方面, 嵌合基因包括在种子成熟期间表现出增加的表达的启动子。这样的启动子的实例包括与下述成熟特异性单子叶植物贮藏蛋白之一相关的成熟特异性启动区: 水稻谷蛋白、水稻素和谷醇溶蛋白, 大麦醇溶蛋白, 小麦醇溶蛋白和谷蛋白, 玉米醇溶蛋白和谷蛋白, 燕麦谷蛋白, 和高粱醇溶蛋白, 小米 pennisetin, 和黑麦醇溶蛋白。

[0300] 在一方面, 嵌合基因包括 i) 来自成熟特异性单子叶植物贮藏蛋白基因的启动子; ii) 第一 DNA 序列, 其可操作地连接至启动子, 编码单子叶植物种子特异性信号序列 (例如 N 端前导序列或 C 端尾随序列), 所述信号序列能够将其连接的多肽靶向至胚乳细胞, 优选胚乳细胞细胞器, 例如蛋白贮藏体; 和 iii) 第二 DNA 序列, 其与第一 DNA 序列按照翻译框连接, 编码细胞培养基组分。信号序列优选在植物细胞中从细胞培养基组分切除。

[0301] 然后, 通常将嵌合基因放入合适的植物转化载体, 所述载体具有 (i) 在嵌合基因上游和 / 或下游的伴随序列, 其为质粒或病毒来源并为载体提供必需的特性以允许载体将 DNA 从细菌移至期望植物宿主; (ii) 选择标记序列; 和 (iii) 转录终止区, 一般在载体的与转录起始调控区相反的一端。对于各种植物宿主细胞, 许多类型的适当的表达载体和合适调控序列为本领域已知。

[0302] 为了从单子叶植物种子贮藏蛋白载体最终释放细胞培养基组分, 可以提供至少一个选择纯化标签和 / 或至少一个特异性蛋白酶切割位点。例如, 为了从内源植物蛋白释放细胞培养基组分, 可以在结构域之间按照读框设计提供化学切割位点的甲硫氨酸或色氨酸残基。其他选择性蛋白酶切割位点包括但不限于肠激酶 (ek)、因子 Xa、凝血酶、V8 蛋白酶、GENENASE™ (枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的变体)、 α -水解蛋白酶或烟草蚀纹病毒蛋白酶。可选地, 融合蛋白的切割可以通过诸如溴化氰或 N-氯代琥珀酰亚胺的化学切割剂进行。

[0303] 许多合适的哺乳动物宿主细胞也为本领域已知, 并且许多可以从美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 获得。实例包括但不限于哺乳动物细胞, 例如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) (ATCC No. CCL61) CHO DHFR 细胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4216-4220(1980)), 人胚肾 (HEK) 293 或 293T 细胞 (ATCC No. CRL1573), 或者 3T3 细胞 (ATCC No. CCL92)。合适的哺乳动物宿主细胞的选择以及转化、培养、扩增、筛选和产物生产和纯化的方法为本领域已知。其他合适的哺乳动物细胞系为猴 COS-1 (ATCC No. CRL1650) 和 COS-7 细胞系 (ATCC No. CRL1651), 以及 CV-1 细胞系 (ATCC No. CCL70)。其他示例性哺乳动物宿主细胞包括灵长类细胞系和啮齿类细胞系, 其包括转化的细胞系。

[0304] 利用本发明的 DNA 构建体 (或来源于所述 DNA 构建体的 RNA), 无细胞的转录和翻

译系统也可以用于产生这样的蛋白。

[0305] 本发明的重组蛋白的产生可以通过本领域众所周知的工艺从包含表达系统的遗传工程宿主细胞制备。因此,在另一方面,本发明涉及包含编码细胞培养基组分的一种多核苷酸或多种多核苷酸的表达系统,用这样的表达系统转基因的宿主细胞,以及通过重组技术产生这样的蛋白。在一实施方案中,宿主细胞内源性表达所关注的热休克蛋白。

[0306] 在必需纯化表达的本发明补充物的蛋白的情况下,本发明的蛋白可以在裂解细胞之前从细胞环境回收,或者在细胞裂解之后回收。所述蛋白可以通过众所周知的方法从重组细胞培养物回收和纯化,包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析也用于纯化。

[0307] 对专利、公开的专利申请和相关出版物的搜索会为阅读本公开的本领域技术人员提供用于制备和纯化白蛋白的显著可行的方法。例如,美国专利第 4,075,197 号;第 4,086,222 号;第 4,093,612 号;第 4,097,473 号;第 4,136,094 号;第 4,228,154 号;第 5,250,662 号;第 5,656,729 号;第 5,677,424 号;第 5,710,253 号;第 5,728,553 号;第 5,994,507 号;第 6,001,974 号;第 6,638,740 号;第 6,617,133 号;和第 7,423,124 号公开了各种用于纯化白蛋白的工艺。在一方面,利用上文列出的任何这些领域公认的工艺纯化用于本发明的白蛋白,然后在水溶液中将白蛋白与热休克蛋白混合。包括阴离子交换层析和 ATP 琼脂糖亲和层析在内的用于纯化热休克蛋白的方法为本领域众所周知。(Welch & Feramisco, J. Biol. Chem. 257(24)14949-14959;(1982);Welch & Feramisco, Mol. Cell. Biol. 5(6)1229-1237(1985)。当多肽在细胞内合成、分离和/或纯化期间变性时,众所周知的用于重折叠蛋白的技术可以用于再生活性构象。

[0308] 在一优选的方面,利用使得能够直接共纯化重组白蛋白和热休克蛋白或 hsp 蛋白复合物的方法纯化重组白蛋白,例如下文和实施例部分所述。在一方面,重组白蛋白在水稻中产生,并且热休克蛋白为内源性水稻热休克蛋白。

[0309] 在这个方法的一方面,用表达载体增加宿主细胞中重组白蛋白的表达,而宿主细胞内源性热休克蛋白的表达是通过激活宿主细胞 hsp 基因表达来完成的。在另一方面,用表达载体增加热休克蛋白的表达。在另一方面,用表达载体增加热休克蛋白和白蛋白的表达。在另一方面,编码热休克蛋白和白蛋白的核酸序列位于同一表达载体中。

[0310] 由于白蛋白和 hsp70 相似的电负性,阴离子交换层析是制备富含 Hsp 的白蛋白的优选方法。例如,白蛋白和 Hsp70 在高 pH(7.5 和以上)下结合至含有树脂的阴离子交换柱,所述树脂由固定在适合多肽离子交换的珠(大分子排阻极限及合适的大小)上的季铵或二乙氨基乙基组成。这样的树脂的实例为 General Electric(GE)Q 琼脂糖和 GE DEAE 琼脂糖。由于其相似的电负性,利用低 pH 条件(低于 pH 6.5)也允许在阳离子交换剂上共纯化两个分子。这样的阳离子交换剂的实例为基于 GE 羧甲基琼脂糖和磺酸琼脂糖的树脂。因为白蛋白和 Hsp70 具有相似的等电点,混合模式树脂也可以用于共纯化白蛋白和 Hsp70。因为众所周知 Hsp70 和白蛋白均结合至脂肪酸和其他疏水分子,所以还可以在诸如辛基琼脂糖(GE)的基于疏水作用的树脂上共纯化白蛋白和 Hsp70。由于 Hsp70 蛋白和白蛋白的大小相似(65-75kDa),利用高于和低于 65-75kDa 的分子排阻,通过切向流超滤的两种蛋白的共纯化和 Hsp70 的富集也可以用于共纯化并因此富集白蛋白与 hsp。

[0311] 还由于其相似的分子量,任何基于大小分离多肽的方法会有效地共纯化白蛋白和 hsp70,例如分子筛和凝胶过滤或大小排阻层析。此外,由于 Hsp70 和白蛋白在疏水性和电负性或表面电荷方面的相似性质,其可以通过在许多条件下的沉淀来共纯化。这些条件中的一些为通过硫酸铵沉淀,通过诸如尿素的变性剂沉淀,或者基于等电点和溶解度沉淀。

[0312] 所述方法也适用于从富集来自其他来源的白蛋白与 hsp。例如来源于天然和转基因动物原料血清的白蛋白,以及从重组生物和基于原核和真核细胞的组织培养系统产生的白蛋白,包括诸如哺乳动物细胞的脊椎动物细胞和诸如昆虫的无脊椎动物细胞,以及植物和诸如酵母的真菌等。

[0313] 对专利、公开的专利申请和相关出版物的搜索还会为阅读本公开的本领域技术人员提供用于制备和纯化转铁蛋白相关蛋白的显著可行的方法。例如,美国专利第 7,368,141 号;第 7,354,902 号;第 5,708,149 号;第 5,596,082 号;第 5,169,936 号;第 4,791,193 号;和第 4,667,018 号公开了各种用于纯化转铁蛋白相关蛋白的工艺。

[0314] IV. 示例性细胞

[0315] 不希望被理论约束,预期任何易于凋亡的细胞均可以用于本发明的方法,包括原代细胞、永生化细胞、分化细胞、未分化细胞或诸如干细胞的不同程度特化的细胞。在一特定实施方案中,用包含编码所关注蛋白的核苷酸序列的核酸分子转染本发明的方法中所用的细胞,所关注蛋白例如治疗性蛋白或抗体。

[0316] 在一特定实施方案中,本发明的方法中所用的细胞为真核细胞,例如哺乳动物细胞。哺乳动物细胞是实例包括但不限于,例如,人 B 细胞和 T 细胞及其衍生物,如杂交瘤,以及表达 B 或 T 细胞标记的细胞;SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系(293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞,Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980));CHO-K1 细胞(ATCC CCL-61),人 PER.C6 细胞(Crucell, NV),小鼠支持细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HeLa, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);buffalo 大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI 细胞(Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci., 383: 44-68(1982));MRC 5 细胞;FS4 细胞;NSO 小鼠骨髓瘤细胞(ECACC;SIGMA)和人肝癌系(Hep G2)。有用的细胞系的额外的实施包括但不限于,HT1080 细胞(ATCC CCL 121)、MCF-7 乳腺癌细胞(ATCC BTH 22)、K-562 白血病细胞(ATCC CCL 243)、KB 癌细胞(ATCC CCL 17)、2780AD 卵巢癌细胞(参见 Van der Blick, A. M. et al., Cancer Res. 48:5927-5932(1988)、Raji 细胞(ATCC CCL 86)、Jurkat 细胞(ATCC TIB 152)、Namalwa 细胞(ATCC CRL 1432)、HL-60 细胞(ATCC CCL 240)、Daudi 细胞(ATCC CCL 213)、RPMI 8226 细胞(ATCC CCL 155)、U-937 细胞(ATCC CRL 1593)、Bowes 黑色素瘤细胞(ATCC CRL 9607)、WI-38VA13 亚系 2R4 细胞(ATCC CLL 75.1)和 MOLT-4 细胞(ATCC CRL 1582),以及通过人细胞和另一物种细胞的融合所产生的异源杂交瘤细胞。这些和其他细胞和细胞系可商购,例如从美国典型培养物保藏中心(Virginia, USA)。许多其他细胞系为本领域已知并且会为普通技术人员所熟悉;因此这样的细胞系同样可以用于本发明的方法。在一特定实施方案中,本发明的方法中

所用的细胞为 CHO 细胞或 NSO 细胞。杂交瘤和产生抗体的细胞也可以用于本发明的方法。

[0317] 在另一实施方案中,在本发明的任何方法中所用的细胞为干细胞。干细胞是通过在单细胞水平其自我更新和分化以产生子代细胞的能力所定义的未分化细胞,所述子代细胞包括自我更新先祖、非更新先祖和终末分化细胞。干细胞还通过其下述能力表征:在体外分化为来自多个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的各种细胞系的功能细胞;以及在移植之后产生多个胚层的组织;以及在注射入胚泡之后基本上促成如果不是全部,也是大部分组织。

[0318] 可以在本发明的任何方法中使用的人胚胎干细胞的类型包括来源于妊娠之后形成的组织的人胚细胞的确立系,所述组织包括在妊娠期间任何时间所取的胚前期组织(例如,胚泡)、胚胎组织或胎儿组织,所述时间通常但非必需在妊娠约 10-12 周之前。非限制性实例为人胚胎干细胞或人胚胎生殖细胞的确立系,例如人胚胎干细胞系 H1、H7 和 H9(WiCell)。还考虑在初步建立或稳定这样的细胞期间使用本公开的组合物,在这种情况下源细胞为直接取自源组织的原代多能细胞。取自己在无饲养细胞下培养的多能干细胞群的细胞也适合。突变人胚胎干细胞系也适合,例如 BG01v (BresaGen, Athens, Ga.)。在一实施方案中,人胚胎干细胞如 Thomson et al. 所述制备(美国专利 No. 5,843,780;Science 282:1145,1998;Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff.,1998;Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:7844,1995)。

[0319] 此外,杂交瘤细胞也可以用于本发明的方法。术语“杂交瘤”指通过免疫来源的永生细胞系和产生抗体的细胞的融合所产生的杂交细胞系。该术语涵盖异源杂合骨髓瘤融合的子代,其为人细胞和鼠骨髓瘤细胞系融合随后与血浆细胞融合的结果,通常称为三源杂交瘤(trioma)细胞系。此外,该术语包括任何产生抗体的永生化杂交细胞系,例如四源杂交瘤(quadroma)。参见,例如,Milstein et al.,Nature,537:3053(1983)。所述杂交细胞系可以是任何物种的,包括人、兔和小鼠。

[0320] 在一些实施方案中,本发明的方法中所用的细胞系为产生抗体的细胞系。可以利用技术人员众所周知的技术来选择和培养产生抗体的细胞系。参见,例如,Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York(1991),其整体援引并入本文,包括附录。总的来说,任何适合在细胞培养中表达重组蛋白的细胞均可以用于本发明的方法。

[0321] 在一些实施方案中,本发明的方法中所用的细胞可以包括异源核酸分子,其编码期望重组蛋白,例如,期望利用本发明的方法产生的治疗性蛋白或抗体。在一特定实施方案中,本发明的方法有利于在一种或多种污染物的水平减少的情况下产生高滴度的期望重组蛋白,例如,治疗性蛋白或抗体。

[0322] V. 细胞培养基

[0323] 任何合适的培养基或适合细胞生长和蛋白生产的补料培养基可以用于本发明的方法。根据其 与宿主细胞和所关注工艺的相容性选自合适的培养基或补料培养基。合适的培养基或补料培养基为本领域众所周知并且包括但不限于商业培养基,例如 Ham's F10 (SIGMA)、最小必需培养基 (SIGMA)、RPMI-1640 (SIGMA) 和达尔伯克改良伊格尔培养基 (SIGMA),适合培养动物细胞。此外,可以使用 Ham and Wallace, (1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes and Sato, (1980) Anal. Biochem., 102:255;美国专利 No. 4,767,704;4,657,866;

4, 927, 762 ;5, 122, 469or 4, 560, 655 ;国际公开号 WO 90/03430 ;和 WO 87/00195 所述的任何培养基。

[0324] 当必需时,任何这样的培养基可以补充激素和/或其他生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(例如 HEPES)、核苷(例如腺苷和胸苷)、抗生素(例如 Gentamycin™)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)以及葡萄糖或等效的能量来源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必需补充物。诸如温度、pH 等的培养条件是选择用于表达的宿主细胞先前所用的培养条件,并且对于普通技术人员会很明显。特定细胞的必需生长因子很容易凭经验确定而不用过多实验,例如 Mammalian Cell Culture (Mather, J. P. ed., Plenum Press, N. Y. (1984), and Barnes and Sato, Cell, 22 :649 (1980) 所述。

[0325] 其他适合在重组脊椎动物细胞培养中适应所关注蛋白的合成方法、载体和宿主细胞如 Gething et al., Nature, 293 :620-625 (1981) ;Mantei et al., Nature, 281 :40-46 (1979) ;EP 117, 060 ;and EP 117, 058 所述。总的来说,用于最大化哺乳动物细胞培养的生产力的原理、方案和实用技术可以在 Mammalian Cell Biotechnology :A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) 中找到。

[0326] VI. 示例性细胞培养表达产物

[0327] 在任何本发明的方法的一方面,本发明的补充物用于提高细胞的活力和生长,所述细胞用于表达和产生所关注蛋白。所述细胞可以内源性表达所关注蛋白,或者可以为转基因的工程细胞系,以便在该细胞背景之上的水平表达所关注蛋白。

[0328] 细胞可以转基因以通过用编码所关注蛋白的核酸转化,或通过促进内源基因表达的激活序列的转化来表达蛋白。在一方面,所关注蛋白可以表达自表达载体,其中所关注蛋白的编码序列可操作地连接至表达控制序列,使得能够组成型或诱导型表达,正如本领域已知的。

[0329] 所关注蛋白可以为任何蛋白或其片段,具有商业、治疗或诊断价值,其包括但不限于细胞因子、趋化因子、激素、抗体、抗氧化分子、工程免疫球蛋白样分子、单链抗体、人源化抗体、融合蛋白、酶、免疫共刺激分子、免疫调节分子、靶蛋白的反式显性负突变体、毒素、条件毒素、抗原、肿瘤抑制蛋白、生长因子、膜蛋白、血管活性蛋白和肽、抗病毒蛋白和核糖核酸酶,以及其衍生物(例如具有相关报道基团)。所关注蛋白还可以包含前体药物激活酶。

[0330] 在一些实施方案中,所关注蛋白包含糖蛋白,或者任何其他具有一种或多种翻译后修饰的蛋白。例如,利用本文所述的方法和组合物可以表达任何适合在真核宿主中产生的蛋白。

[0331] 本发明的方法可以用于产生任何期望重组蛋白或其片段。在一些实施方案中,利用本文所述方法产生的重组蛋白为治疗性蛋白。在其他实施方案中,所述重组蛋白为抗体或其功能片段。可以利用本发明的方法产生的抗体包括,例如,多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、全人、人源化、单链、嵌合、杂合、CDR 移植抗体。其可以包含全长 IgG1 抗体或其抗原结合片段,例如, Fab、F(ab')₂、Fv 和 scfv。

[0332] 在本发明范围内的抗体包括但不限于:抗 HER2 抗体,包括曲妥珠单抗 (HERCEPTIN™) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285-4289 (1992), 美国专利 No. 5, 725, 856) ;抗 CD20 抗体,例如美国专利 No. 5, 736, 137 中的嵌合抗

CD20⁺ C2B8⁺ (RITUXANTM)、如美国专利 No. 5, 721, 108, B1 中的 2H7 抗体的嵌合或人源化变体或托西莫单抗 (BEXXARTM.); 抗 IL-8 (St John et al., Chest, 103 :932 (1993), 国际公开第 WO 95/23865 号); 抗 VEGF 抗体, 包括人源化和 / 或亲和力成熟的抗 VEGF 抗体, 例如人源化抗 VEGF 抗体 huA4.6.1 AVASTINTM (Kim et al., Growth Factors, 7 :53-64 (1992), 国际公开第 WO 96/30046 号和 1998 年 10 月 15 日公开的第 WO 98/45331 号); 抗 PSCA 抗体 (W001/40309); 抗 CD40 抗体, 包括 S2C6 及其人源化变体 (W000/75348); 抗 CD11a (美国专利 No. 5, 622, 700, WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4 :3-7 (1991), and Hourmant et al., Transplantation 58 :377-380 (1994)); 抗 IgE (Presta et al., J. Immunol. 151 :2623-2632 (1993), 和国际公开第 WO 95/19181 号); 抗 CD18 (1997 年 4 月 22 日颁发的美国专利 No. 5, 622, 700 或如 1997 年 7 月 31 日公开的 WO 97/26912); 抗 IgE (包括 E25、E26 和 E27; 1998 年 2 月 3 日颁发的美国专利 No. 5, 714, 338 或 1992 年 2 月 25 日颁发的美国专利 No. 5, 091, 313, 1993 年 3 月 4 日公开的 WO 93/04173, 或 1998 年 6 月 30 日提交的国际申请第 PCT/US98/13410 号, 美国专利 No. 5, 714, 338); 抗 Apo-2 受体抗体 (1998 年 11 月 19 日公开的 WO 98/51793); 抗 TNF- α 抗体, 包括 cA2 (REMICADETM)、CDP571 和 MAK-195 (参见, 1997 年 9 月 30 日颁发的美国专利 No. 5, 672, 347, Lorenz et al. J. Immunol. 156 (4) :1646-1653 (1996), 和 Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23 (9) :1461-1469 (1995)); 抗组织因子 (TF) (1994 年 11 月 9 日授权的欧洲专利第 0 420 937 B1 号); 抗人 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白 (1998 年 2 月 19 日公开的 WO 98/06248); 抗 EGFR (如 1996 年 12 月 19 日公开的 WO 96/40210 中的嵌合或人源化 225 抗体); 抗 CD3 抗体, 例如 OKT3 (1985 年 5 月 7 日颁发的美国专利 No. 4, 515, 893); 抗 CD25 或抗 tac 抗体, 例如 CHI-621 (SIMULECTTM) 和 (ZENAPAXTM) (参见 1997 年 12 月 2 日颁发的美国专利 No. 5, 693, 762); 抗 CD4 抗体, 例如 cM-7412 抗体 (Choy et al. Arthritis Rheum 39 (1) :52-56 (1996)); 抗 CD52 抗体, 例如 CAMPATH-1H (Riechmann et al. Nature 332 :323-337 (1988)); 抗 Fc 受体抗体, 例如 Graziano et al. J. Immunol. 155 (10) :4996-5002 (1995) 中的针对 Fc γ RI 的 M22 抗体; 抗癌胚抗原 (CEA) 抗体, 例如 hMN-14 (Sharkey et al. Cancer Res. 55 (23 Suppl) :5935s-5945s (1995); 针对乳腺上皮细胞的抗体, 包括 huBrE-3、hu-Mc 3 和 CHL6 (Ceriani et al. Cancer Res. 55 (23) :5852s-5856s (1995); and Richman et al. Cancer Res. 55 (23 Supp) :5916s-5920s (1995)); 结合至结肠癌细胞的抗体, 例如 C242 (Litton et al. Eur. J. Immunol. 26 (1) :1-9 (1996)); 抗 CD38 抗体, 例如 AT 13/5 (Ellis et al. J. Immunol. 155 (2) :925-937 (1995)); 抗 CD33 抗体, 例如 Hu M195 (Jurcic et al. Cancer Res. 55 (23 Suppl) :5908s-5910s (1995)) 和 CMA-676 或 CDP771; 抗 CD22 抗体, 例如 LL2 或 LymphoCide (Juweid et al. Cancer Res. 55 (23 Suppl) :5899s-5907s (1995)); 抗 EpCAM 抗体, 例如 17-1A (PANOREXTM.); 抗 GpIIb/IIIa 抗体, 例如阿昔单抗或 c7E3Fab (REOPROTM); 抗 RSV 抗体, 例如 MEDI-493 (SYNAGISTM.); 抗 CMV 抗体, 例如 PROTOVIRTM.; 抗 HIV 抗体, 例如 PRO542; 抗肝炎抗体, 例如抗 Hep B 抗体 OSTAVIRTM; 抗 CA 125 抗体 OvaRex; 抗独特型 GD3 表位抗体 BEC2; 抗 $\alpha . v . \beta . 3$ 抗体 VITAXINTM; 抗人肾细胞癌抗体, 例如 ch-G250; ING-1; 抗人 17-1A 抗体 (3622W94); 抗人结直肠癌抗体 (A33); 针对 GD3 神经节苷脂的抗人黑色素瘤抗体 R24; 抗人鳞状细胞癌 (SF-25); 和抗人白细胞抗原 (HLA) 抗体, 例如 Smart ID10 和抗 HLA DR 抗体 Oncolym (Lym-1)。本文抗体的优选的靶抗原为: HER2 受体、VEGF、IgE、CD20、

CD11a 和 CD40。

[0333] 所述重组蛋白可以为细胞蛋白,例如受体(例如,膜结合或胞质的)或结构蛋白(例如细胞骨架蛋白)。所述重组蛋白可以为细胞分泌或一个或多个信号转导途径内部所用的细胞因子。非限制性实例包括但不限于,CD2,CD3,CD4,CD8,CD11a,CD14,CD18,CD20,CD22,CD23,CD25,CD33,CD40,CD44,CD52,CD80(B7.1),CD86(B7.2),CD147,IL-1,IL-2,IL-3,IL-7,IL-4,IL-5,IL-8,IL-10,IL-2 受体,IL-4 受体,IL-6 受体,IL-13 受体,IL-18 受体亚基,PDGF,EGF 受体,VEGF 受体,肝细胞生长因子,护骨蛋白配体,干扰素 γ ,B 淋巴细胞刺激因子 C5 补体 TAG-72,整联蛋白 $\alpha 4 \beta 7$,整联蛋白 VLA-4,B2 整联蛋白,TRAIL 受体 1、2、3 和 4,RANK,RANK 配体,TNF,粘附分子 VAP-1,上皮细胞粘附分子(EpCAM),细胞间粘附分子-3(ICAM-3),白细胞整合素粘附素,血小板糖蛋白 gp IIb/IIIa,心肌肌球蛋白重链,甲状旁腺素,rNAPc2 以及 CTLA4(其为细胞毒性的 T 淋巴细胞相关抗原)。

[0334] 所述重组蛋白还可以来源于感染物,例如病毒、细菌或真菌。所述蛋白可以来源于细菌膜或细胞壁,或者可以来源于细菌胞质溶胶。所述蛋白可以为细菌或酵母酶、转录因子或者结构蛋白。所述细菌或酵母蛋白可以为膜结合、胞质或分泌的。感染物的实例包括但不限于,变形链球菌、和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、和白色念珠菌。

[0335] 本发明的方法还可以用于产生重组融合蛋白,其包含所有或部分上文提到的任何蛋白。例如,可以利用本发明的方法产生重组融合蛋白,其包含一种上文提到的蛋白加上多聚化结构域,例如亮氨酸拉链、卷曲螺旋、抗体的 Fc 部分或本质上相似的蛋白。参见例如国际申请第 W0 94/10308 号;Lovejoy et al.(1993),*Science* 259:1288-1293;Harbury et al.(1993),*Science* 262:1401-05;Harbury et al.(1994),*Nature* 371:80-83;Hangkansson et al.(1999),*Structure* 7:255-64。

[0336] 本发明还涵盖包括一种或多种通过本文所述方法产生的重组蛋白在内的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物还包括药学可接受的载体。如本文所用的术语“药学可接受的载体”表示一种或多种适合给予个体的相容的固体或液体填充剂、稀释剂或封装物质。

[0337] VII. 干细胞

[0338] 在一实施方案中,在基本上无饲养细胞但仍然支持人胚胎干细胞增殖而不进行实质分化的培养系统中培养人胚胎干细胞,所述培养系统包含本发明的补充物。利用通过事先与另一细胞类型培养来提供条件并且还包含本发明的补充物的培养基支持人胚胎干细胞在无饲养层培养中生长而不分化。可选地,利用包含本发明的补充物的化学成分确知培养基来支持人胚胎干细胞在无饲养层培养中生长而不分化。无饲养层、无血清培养系统的实例包括美国专利申请 US20050148070、US20050244962、US20050233446,美国专利 No. 6,800,480 以及 PCT 公开 W02005065354 和 W02005086845 所公开的培养系统,其中将胚胎干细胞维持在补充了能够触发胚胎干细胞自我更新的不同生长因子的无条件血清替代(SR)培养基中。

[0339] 在一可选实施方案中,人胚胎干细胞最初与支持人胚胎干细胞并且还包含本发明的补充物的饲养细胞层培养。然后将人胚胎干细胞转移至基本上不含饲养细胞但仍然支持人胚胎干细胞增殖而不进行实质分化的培养系统,并且该培养系统还包含本发明的补充物。在任何这些方法中,使用本发明的补充物导致细胞生长速率显著增加,并且细胞的活力

显著提高。

[0340] 适合于本发明的补充物一起使用的条件培养基的实例如 US20020072117, 美国专利 No. 6, 642, 048, W02005014799, and Xu et al (Stem Cells 22 :972-980, 2004) 所公开的。适合与本发明的补充物一起使用的化学成分确知培养基的实例可以在 US20070010011 中找到。

[0341] 饲养细胞的实例包括选自成纤维细胞、MRC-5 细胞、胚肾细胞、间充质细胞、骨肉瘤细胞、角质形成细胞、软骨细胞、输卵管上皮细胞、肝细胞、心肌细胞、骨髓基质细胞、颗粒细胞、骨骼肌细胞、肌细胞和主动脉内皮细胞的饲养细胞。在一优选实施方案中, MRC-5 细胞具有 ATCC 目录号 55-X ;转化的并且具有 ATCC 登录号 CRL-2309 ;人骨肉瘤细胞具有 ATCC 登录号 HTB-96 ;并且间充质细胞是具有 ATCC 登录号 CRL-1486 的人胎腭间充质细胞。在另一优选实施方案中, 人成纤维细胞为皮肤瘢痕疙瘩成纤维细胞 KEL FIB 并具有 ATCC 登录号 CRL-1762, 或者为胎儿皮肤成纤维细胞 ;并且骨髓基质细胞 HS-5 具有 ATCC 登录号 CRL-11882。

[0342] 合适的培养基可以由以下组分制成, 例如, 达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM), Gibco # 11965-092 ;敲除达尔伯克改良伊格尔培养基 (KO DMEM), Gibco#10829-018 ;Ham' s F12/50% DMEM 基础培养基 ;200mM L- 谷氨酰胺, Gibco#15039-027 ;非必需氨基酸溶液, Gibco 11140-050 ; β - 巯基乙醇, Sigma#M7522 ;人重组碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), Gibco#13256-029。

[0343] 在一实施方案中, 将人胚胎干细胞接种在合适的培养基质上, 在根据本发明的方法处理之前用包含本发明的补充物的组合物处理所述培养基质。在一实施方案中, 所述处理为细胞外基质组分, 例如, 来源于基底膜或可以形成部分粘附分子受体 - 配体偶联的细胞外基质组分。在一实施方案中, 合适的培养基质为 MATRIGEL (Becton Dickenson)。MATRIGEL 是来自 Engelbreth-Holm-Swarm 肿瘤细胞的可溶性制品, 其在室温下形成凝胶以形成重建的基底膜。

[0344] 其他细胞外基质组分和组分混合物适合作为替代物, 并且可以与本发明的补充物一起使用。其可以包括层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白、硫酸乙酰肝素等, 单独或与本发明的补充物各种组合。

[0345] 在另一实施方案中, 本发明涵盖胚胎干细胞培养, 其包含人多能干细胞和包含本发明的补充物的无饲养层、无血清培养系统。在一实施方案中, 本发明涵盖人多能干细胞培养, 其包含人多能干细胞和包含本发明的补充物的无饲养层、无血清培养系统。

[0346] 在另一实施方案中, 本发明涵盖胚胎干细胞培养, 其包含人胚胎干细胞和包含本发明的补充物的人饲养细胞培养物。在另一实施方案中, 本发明涵盖人多能干细胞培养, 其包含人多能干细胞和包含本发明的补充物的人饲养细胞培养物。

[0347] 在另一实施方案中, 本发明提供了用于获得包含表达多能性标记的细胞的细胞群体的方法, 其包含以下步骤 :

[0348] 培养人胚胎干细胞,

[0349] 使人胚胎干细胞分化为表达多能性标记的细胞, 其中在本发明的补充物的存在下引导分化。

[0350] 在另一实施方案中, 本发明提供了用于获得包含表达外胚层、内胚层或中胚层细

胞标记、特征的细胞的细胞群体的方法,其包含以下步骤:

[0351] 培养多能性干细胞;

[0352] a. 使多能性干细胞分化为表达外胚层、内胚层或中胚层细胞标记特征的细胞,其中在本发明的补充物的存在下引导分化。

[0353] 在任何这些方法中,可以通过本领域的任何方法使干细胞分化为表达内胚层、外胚层或中胚层谱系标记特征的细胞。例如,根据 D' Amour et al, Nature Biotechnology 23,1534-1541(2005), by Shinozaki et al, Development 131,1651-1662(2004), McLean et al., Stem Cells 25,29-38(2007), D' Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401(2006) 所公开的方法,可以使表达多能性标记的细胞分化为表达定形内胚层谱系标记特征的细胞。

[0354] 可以通过本领域的任何方法使表达内胚层谱系标记特征的细胞进一步分化为表达胰腺内分泌谱系标记特征的细胞。例如,根据 D' Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401(2006) 所公开的方法,可以使表达胰腺内胚层谱系标记特征的细胞分化为表达胰腺内分泌谱系标记特征的细胞,其中在本发明的补充物的存在下引导分化。

[0355] 在任何这些分化方法的一方面,在用细胞外基质包被的组织培养基质上培养和分化人胚胎干细胞。细胞外基质可以为提取自小鼠肉瘤细胞的增溶基底膜制品 (BD Biosciences 所售,商品名 MATRIGEL)。可选地,细胞外基质可以为生长因子减少的 MATRIGEL。可选地,细胞外基质可以为纤连蛋白。在一可选实施方案中,在用人血清包被的组织培养基质上培养和分化人胚胎干细胞。在一方面,用细胞外基质和本发明的补充物包被组织培养基质。

[0356] 在包被组织培养基质之前可以稀释细胞外基质。用于稀释细胞外基质和包被组织培养基质的合适方法的实例可以在 Kleinman, H. K., et al., Biochemistry 25 :312(1986), and Hadley, M. A., et al., J. Cell. Biol. 101 :1511(1985) 中找到。

[0357] 在干细胞分化方法的一方面,培养基应该含有足够低浓度的诸如胰岛素和 IGF 的某些因子以允许人胚胎干细胞分化为内胚层、外胚层或中胚层谱系的细胞 (如 W02006020919 所公开的)。这可以通过降低血清浓度,或者可选地通过利用缺少胰岛素和 IGF 的化学成分确知培养基来实现。化学成分确知培养基的实例如 Wiles et al (Exp Cell Res. 1999 Feb. 25 ;247(1) :241-8.) 所公开的。在任何这些方法的一优选实施方案中,培养基包含本发明的补充物。

[0358] 培养基还可以含有至少一种其他附加因子,其可以促进从人胚胎干细胞形成表达内胚层、中胚层或外胚层谱系标记特征的细胞。所述至少一种附加因子可以为,例如,烟酰胺,包括 TGF- β 1、2 和 3 在内的 TGF- β 家族成员,血清白蛋白,成纤维细胞生长因子家族成员,血小板源性生长因子 -AA 和 -BB,富含血小板血浆,胰岛素生长因子 (IGF-I, II),生长分化因子 (GDF-5, -6, -8, -10, 11),胰高血糖素样肽 -I 和 II (GLP-I 和 II), GLP-1 和 GLP-2 模拟体 (mimetobody), 毒蜥外泌肽 -4, 视黄酸,甲状旁腺素,胰岛素,孕酮,抑酶肽,氢化可的松,乙醇胺, β 巯基乙醇,表皮生长因子 (EGF),胃泌素 I 和 II,铜螯合剂,例如,三乙烯五胺,毛喉素,丁酸钠 (Na-Butyrate),激活蛋白, β 动物纤维素, ITS,头发生素,神经突生长因子,结 (noda1),丙戊酸,制滴菌素 A,丁酸钠 (sodium butyrate),肝细胞生长因子 (HGF),鞘氨醇 1, VEGF, MG132 (EMD, CA), N2 和 B27 补充物 (Gibco, CA),类固醇生物碱,例如,环杷

明 (EMD, CA), 角质形成细胞生长因子 (KGF), Dickkopf 蛋白家族, 牛垂体提取物, 胰岛新生相关蛋白 (INGAP), Indian hedgehog, sonic hedgehog, 蛋白酶体抑制剂, notch 途径抑制剂, sonic hedgehog 抑制剂, 或者其组合。在任何这些方法的一优选实施方案中, 含有至少一种上文所列的附加因子的培养基还包含本发明的补充物。

[0359] 所述至少一种其他附加因子可以由获得自胰腺细胞系的条件培养基供应, 例如, PANC-1 (ATCC No :CRL-1469)、CAPAN-1 (ATCC No :HTB-79)、BxPC-3 (ATCC No :CRL-1687)、HPAF-II (ATCC No :CRL-1997)、诸如 HepG2 (ATCC No :HTB-8065) 的肝细胞系和诸如 FHs 74 (ATCC No :CCL-241) 的肠细胞系。在任何这些方法的一优选实施方案中, 条件培养基还包含本发明的补充物。

[0360] 在另一实施方案中, 本发明涵盖在人或动物中将任何上述干细胞的细胞或组织用于疾病或疾病状况的实验性、治疗性和预防性治疗的方法。优选地, 所述疾病选自帕金森病、阿尔茨海默病、多发性硬化、脊髓损伤、中风、黄斑变性、烧伤、肝衰竭、心脏病、糖尿病、杜兴氏肌营养不良、成骨不全、骨关节炎、类风湿关节炎、贫血、白血病、乳腺癌、实体瘤和 AIDS。在一优选实施方案中, 所述疾病为帕金森病或阿尔茨海默病。在一更优选实施方案中, 所述疾病为帕金森病。

[0361] VIII. 重组蛋白的大规模生产

[0362] 在一实施方案中, 通过使宿主细胞在补充物的存在下生长, 本发明的补充物可以用于产生所关注的蛋白。在一实施方案中, 细胞培养在搅动釜生物反应器系统中进行, 并且使用补料分批培养程序。在另一实施方案中, 使用 wave 一次性生物反应器。在生物反应器系统中, 生物反应器的大小大到足以产生期望量的所关注蛋白, 例如 1,000 升或 12,000 升, 但是并不局限于这样的大小, 因为小很多 (即 2 升、400 升) 或更大 (即 25000 升、50,000 升) 的生物反应器容器可以适合。在优选的补料分批培养中, 最初将哺乳动物宿主细胞和培养基供应至培养容器, 并且在培养期间连续或以离散增量将额外的培养营养补料至培养物, 在培养终止之前有或无周期细胞和 / 或产物收获。补料分批培养可以包括, 例如, 半连续补料分批培养, 其中定期去除全部培养物 (包括细胞和培养基) 并用新鲜培养基替换。补料分批培养区别于单批培养, 在单批培养中, 在培养过程的开始将用于细胞培养的所有组分 (包括细胞和所有培养营养) 供应至培养容器。补料分批培养可以进一步区别于灌注培养, 只要在过程期间不从培养容器去除上清, 但是在培养过程终止时从培养容器去除上清 (在灌注培养中, 通过例如过滤、封装、锚定至微载体等将细胞限制在培养物中, 并且连续或间歇地将培养基引入培养容器和从培养容器去除)。

[0363] 此外, 按照可以适合预期的特定宿主细胞和特定生产计划的任何方案或路线可以增殖所培养的细胞。因此, 本发明考虑单步或多步培养过程。在单步培养中, 将宿主细胞接种至培养环境, 并且在细胞培养的单个生产期期间使用本发明的方法步骤。可选地, 设想有多阶段培养。在多阶段培养中, 可以在许多步骤或时期培养细胞。例如, 可以使细胞在第一步或生长期培养中生长, 其中将可能从储存在取出细胞接种至包含本发明的补充物的适合促进生长和高活力的培养基。通过将新鲜培养基加入宿主细胞培养物可以将细胞维持在生长期一段合适的时间。

[0364] 根据本发明的一优选方面, 设计补料分批或连续细胞培养条件以促进哺乳动物细胞在细胞培养生长期的生长。在生长期中, 使细胞在最大化生长的条件生长一段时间。诸

如温度、pH、溶解氧 (dO_2) 等的培养条件是用于特定宿主的培养条件,并且对于普通技术人员会很明显。一般,利用酸(例如, CO_2) 或碱(例如, Na_2CO_3 或 $NaOH$) 将 pH 调至约 6.5 和 7.5 之间的水平。培养诸如 CHO 细胞的哺乳动物细胞的合适的温度范围在约 30 至 38℃ 之间,并且优选约 37℃,而合适的 dO_2 在 5-90% 空气饱和度之间。

[0365] 在特定阶段,细胞可以用于接种细胞培养的生产期或步骤。可选地,如上所述,生产期或步骤可以与接种或者生长期或步骤连续。

[0366] 根据本发明,在细胞培养的生产期期间控制细胞培养环境。根据目前公开的方法的步骤,可以协调加入本发明的补充物,以便获得期望含量和质量的所关注蛋白并将其维持在所得的细胞培养液中。在一优选方面,细胞培养的过渡期在细胞培养的生产期之前,其中本发明的补充物的加入启动细胞培养的生产期。

[0367] 在任何上述方法中,预期在细胞培养基中包括期望量的诸如丁酸或制滴菌素 A 的试剂与本发明的补充物组合是可取的。各种形式的丁酸及其盐为本领域已知,例如丁酸和丁酸钠,以及可从诸如 Sigma Chemical Co 的来源公开获得的。文献已报道丁酸提高细胞培养的生产力和蛋白表达 [Arts et al., *Biochem J.*, 310:171-176(1995); Gorman et al., *Nucleic Acids Res.*, 11:7631-7648(1983); Krugh, *Mol. Cell. Biochem.* 42:65-82(1982); Lamotte et al., *Cytotechnology*, 29:55-64(1999); Chotigeat et al., *Cytotechnology*, 15:217-221(1994)]。制滴菌素 A (TSA) 是组蛋白脱乙酰酶的抑制剂,并且在提高细胞培养中的生产力和蛋白表达方面发挥与丁酸相似的作用 [Medina et al., *Cancer Research*, 57:3697-3707(1997)]。虽然丁酸对蛋白表达具有一些正面效应,本领域还注意到,在一定的浓度下,丁酸可以在培养细胞中诱导凋亡,并且从而降低培养物的活力以及活细胞密度 [Hague et al., *Int. J. Cancer*, 55:498-505(1993); Calabresse et al., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 195:31-38(1993); Fillipovich et al., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 198:257-265(1994); Medina et al., *Cancer Research*, 57:3697-3707(1997)]。在本发明的方法中,可以在生产期的开始将期望量的丁酸或 TSA 加入细胞培养物,并且更优选地,可以在温度变化已实现之后加入细胞培养基。可以按照本领域技术人员凭经验确定的期望量加入丁酸或 TSA,但是优选地,将丁酸以约 1 至约 25mM 的浓度加入细胞培养物,并且更优选地,以约 1 至约 6mM 的浓度。

[0368] 所关注蛋白的表达可以在样品中直接测量,例如,通过 ELISA、常规 DNA 印迹法、RNA 印迹法以定量 mRNA 的转录 [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205(1980)]、斑点印迹法 (DNA 分析) 或原位杂交,利用适当标记的探针。可以使用各种标记,最常见是放射性同位素,并且特别是 ^{32}P 。然而,还可以使用其他技术,例如将生物素修饰的核苷酸用于引入多核苷酸。然后生物素作为结合至抗生物素蛋白或抗体的位点,可以用各种标记来标记抗生物素蛋白或抗体,例如放射性核苷酸、荧光体或酶。可选地,可以使用能够识别特异性双链体的抗体,包括 DNA 双链体、RNA 双链体以及 DNA-RNA 杂种双链体或 DNA-蛋白双链体。然后可以标记抗体,并且在双链体结合至表面处进行测定,这样通过在表面上形成双链体,可以检测结合至双链体的抗体的存在。

[0369] 可选地,可以通过免疫学方法测量基因表达,例如细胞或组织切片的免疫组化染色和细胞培养物或体液的测定,以直接定量基因产物的表达。关于免疫组化染色技术,通常通过脱水和固定制备细胞样品,然后与偶联的基因产物的特异性标记抗体反应,标记通常

是可视化检测的,例如酶促标记、荧光标记、发光标记等。

[0370] 对免疫组化染色和 / 或样品流体测定有用的抗体可以为单克隆或多克隆,并且可以在任何哺乳动物中制备。许多可商购。

[0371] 本文所本发明的补充物还可以用于在转染期间增加转染效率和细胞的活力。在各种转染技术中所用的条件和试剂,例如 Lipofectamine 对细胞相对有毒,而电穿孔可以使细胞遭受严重应激。优选使用更高浓度的转染试剂和更广泛的电穿孔条件以达到更高的转染效率。因此在转染之前、期间和之后加入本发明的补充物可以导致更高的转染效率和重组蛋白的更高产量。

[0372] 本发明的补充物可以用于表达诱导细胞凋亡的所关注蛋白,例如 Apo-2 配体 / TRAIL 或 Fas 配体。本发明的补充物的存在可以阻断这样的凋亡活性并且允许提高所关注蛋白的表达。

[0373] 此外,所述方法可以用于增加经历冷冻 / 储存 / 解冻过程的细胞的活力。在这些过程期间,一般细胞可以丧失活力。加入细胞培养基的凋亡抑制因子的存在可以提供增加的细胞的活力,并且帮助减少或消除细胞等份或瓶之间细胞的活力的变异性。

[0374] IX. 试剂盒

[0375] 本发明还涵盖用于提高细胞的活力的试剂盒。在一实施方案中,根据本发明的试剂盒包含:(a) 一种或多种用于转染的试剂或装置和 (b) 本发明的补充物。在一些实施方案中,本文特征的试剂盒包括说明和 / 或宣传材料,包括关于使用转染装置、转染试剂和补充物的细节。

[0376] 在另一实施方案中,根据本发明的试剂盒包含:(a) 一种或多种用于冷冻或解冻细胞的试剂或装置和 (b) 本发明的补充物。在一些实施方案中,本文特征的试剂盒包括说明和 / 或宣传材料,包括关于冷冻或解冻细胞系的方案和试剂的用途的细节。

[0377] 在另一实施方案中,根据本发明的试剂盒包含:(a) 一种或多种用于培养细胞的组织培养产物和 (b) 本发明的补充物。在一些实施方案中,本文特征的试剂盒包括说明书和 / 或宣传材料,包括关于稀释克隆技术的方案和在这样的方法中试剂的用途的细节。

[0378] 所有出版物、专利和专利申请明确地整体援引并入本文,正如每个单独出版物、专利或专利申请具体并指明单独整体援引并入的相同范围。下述实施例证明但不是为了以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0379] 实施例 1 : 重组人乳铁蛋白的表达

[0380] A. 用于在转基因水稻中表达人乳铁蛋白的表达载体

[0381] 经密码子优化的人乳腺乳铁蛋白的完整核苷酸序列由 Operon Technologies (CA, USA) 合成。用水稻种子蛋白翻译中最常用的密码子重成人乳乳铁蛋白基因 (Genbank 登录号:HSU07642) 以获得最佳的表达水平 (图 1)。虽然改变的密码子的数目占整个序列的 22.46%,氨基酸组合物保持与天然人乳铁蛋白相同。含有密码子优化基因的质粒称为 Lac-ger。用 SmaI/XhoI 消化 Lac-ger,并且将含有乳铁蛋白基因的片段克隆入用 NaeI 部分消化和用 XhoI 完全消化的 pAPI141。为了在水稻种子中表达 hLF,将密码子优化的基因可操作地连接至水稻胚乳特异性谷蛋白 (Gt1) 启动子和 NOS 终止子。将所得的质粒命名为

pAPI164(图2)。

[0382] B. 生产系统

[0383] 选择水稻品种 Taipei 309(日本水稻)作为重组人乳铁蛋白的生产系统,并且通过用质粒 pAPI164 和含有潮霉素磷酸转移酶基因作为选择标记的同伴标记质粒粒子轰击胚性水稻愈伤组织来产生转基因水稻事件。通过该过程获得完全发育、可育的水稻植物。

[0384] C. 稻米中重组人乳铁蛋白的高水平蛋白表达

[0385] 重组人乳铁蛋白的表达是在种子特异性启动子 Gt1 的控制之下的。重组人乳铁蛋白的高水平表达在图3中十分明显,因为筛选了独立的转基因水稻事件。在 Laemli 凝胶上对来自成熟水稻种子提取物的总可溶性蛋白进行电泳,并且用考马斯蓝染色以显现蛋白。如染色的凝胶所示,在所有转基因系中均获得了~80kD 重组乳铁蛋白。重组人乳铁蛋白的表达水平对应种子重量的0.5%。监测重组人乳铁蛋白的稳定表达10代。表达水平维持在糙米种子重量的约0.5%(图4)。

[0386] 实施例2:重组人转铁蛋白的表达和纯化

[0387] 从稻米纯化重组人

[0388] 利用标准食品工业步骤将稻米去壳并磨至平均100目的粉。销毁壳和下文所述的提取之后剩下的固体物质。用提取缓冲液(20mM Tris-碱, pH 7.5)从粉提取重组人转铁蛋白,在室温下搅动40分钟。将助滤剂(Cellpure 300)以20g/L加入提取混合物,然后通过具有10kDa 再生纤维素的压滤机过滤。

[0389] 用30kDa 分子量截留纤维素膜将压滤机滤液渗滤并浓缩至10mM Tris-碱 pH 8.5 以准备用于DEAE层析。将浓缩液装上柱之前用(20mM Tris-碱、40mM氯化钠, pH 7.5)洗涤DEAE柱。装上之后,用3个体积的10mM Tris-碱、0.5%(v/v) Triton X-114, pH 8.5 缓冲液洗涤柱,然后用7个体积的10mM Tris-碱, pH 8.5 缓冲液洗涤柱。然后用20mM Tris-碱、40mM氯化钠, pH 7.5 洗脱转铁蛋白。

[0390] 用10kDa 分子量截留纤维素膜将回收自DEAE柱的转铁蛋白渗滤并浓缩至10mM 磷酸钠、25mM氯化钠, pH 7.0 缓冲液。渗滤之后,在干燥之前通过0.2μm 过滤器过滤重组转铁蛋白。

[0391] 实施例3:稻米中重组人白蛋白的表达

[0392] 比较来自各种数据库的人白蛋白(HSA)的蛋白序列。为了稻米中人白蛋白的适当表达,将登录号 P02768(Swiss-Prot)所代表的共有序列用作基因密码子优化的基础(图5)。基因合成由Blue Heron(Seattle, WA)进行,并且将合成片段插入基于pUC的载体以产生pUC-HSA。在确认DNA和蛋白序列正确之后,用MlyI和XhoI消化pUC-HSA。将含有密码子优化的HSA基因的片段插入已用NaeI和XhoI预切的pAPI405。质粒API405为pAPI141的衍生物,其包括Gt1启动子、Gt1信号序列和nos终止子。

[0393] 将MlyI/XhoI片段插入pAPI405导致pAPI504(图6)。然后用HindIII和EcoRI切割质粒API504。将含有整个表达盒、Gt1启动子、Gt1信号序列、密码子优化的HSA基因和nos终止子的HindIII/EcoRI片段克隆入用相同酶预先消化的pJH2600,导致pAPI508(图7)。质粒JH2600是大肠杆菌和农杆菌之间的穿梭载体。在DNA序列证实之后,为了水稻转化,将pAPI508移入农杆菌AGL-1。在先前所述的过程之后,还通过基于轰击的转化使用质粒API504。通过转化,产生转基因植物并送至温室,在那里转基因R0生长至成熟并产生R1

种子。

[0394] 为了监测水稻种子中 HSA 的表达,利用 10mL 提取缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl) 提取来自每个 R0 植物的 10 个 R1 种子。收集上清,并且通过 ELISA 监测水稻提取物的表达水平 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)。结果显示水稻转基因种子中 HSA 表达水平范围为糙米粉重量的 0.01-0.85% (0.1-8.5 克/kg 粉)。具有最高表达水平的 8 个事件的结果如下表 (表 E1) 所示。

[0395]	表 E1. 最高的 8 个事件中重组 HSA 表达水平	
	系号	表达水平(g/kg 粉)
	508-30	5.5
	508-17	8.0
	508-71	8.7
	508-73	4.0
	508-77	8.5
	508-83	8.5
	508-101	3.0
	508-113	4.0

[0396] 实施例 4 : 作为细胞培养基组分的人乳铁蛋白的纯化

[0397] 为了制备补充了重组人乳铁蛋白的细胞培养基,从米粉纯化重组人乳铁蛋白。选择表达高水平重组人 LF 的转基因水稻系 (164-12)。现在命名为 LF164 的这个系每年种植两代,夏季田间种植和冬季温室种植交替进行。为了蛋白纯化,将表达 rhLF 的水稻脱皮 (Rice Mill, PS-160, Rimac, FL), 然后用锤磨机 (8WA, Schutte-Buffalo, NY) 磨成粉 (平均粒径 100 目)。

[0398] 通过在 50L 罐中将 2kg 米粉和 20L 提取缓冲液 (0.02M 磷酸钠 pH 6.5 和 0.3M 氯化钠) 混合 1h 来从转基因粉提取蛋白。在混合器结束时,允许该悬浮液沉淀过夜或在 3750rpm 离心。在两种情况下,利用基于纤维素/珍珠岩的 M-05 和 M-70 滤器通过板框压滤机 (Ertel Alsop, 8S, NY) 过滤上清。

[0399] 为了进一步纯化,将含有 rhLF 和其他米粉可溶性蛋白的滤液装上离子交换柱。使用装有 SP- 琼脂糖快流速 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ) 的 INDEX 200/500 工艺塔 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ)。以 150-200cm/h 的线性流速运行柱。按照制造商说明进行树脂床的填料、清洗和测试 (HETP Test)。将滤液以 175cm/h 的线性速度装上树脂,并且用含有 0.3M NaCl 的 0.02M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 洗涤直至 A_{280} 回到基线。用含有 0.8M NaCl 的 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 洗脱重组 hLF。分别在 200cm/h 和 150cm/h 进行洗涤和洗脱。

[0400] 将具有 1 ft² 50kDa 聚醚砜 (Pall Biopharmaceutical, MA) 膜的 Centramate 模块 (Pall Biopharmaceutical, MA) 用于洗脱的 hLF 的浓缩和脱盐 (超滤)。以约 1.5L/min 的交叉流速和 10psig 的平均跨膜压差进行过滤。将洗脱的 rhLF 浓缩并脱盐至终体积为 0.25L, 然后冷冻干燥。通常,从 1 千克转基因米粉回收约 3 克纯化的重组人乳铁蛋白。

[0401] 从米粉纯化的重组人乳铁蛋白约 50% 被铁饱和 (部分乳铁蛋白)。然后通过铁吸收处理使 50% 饱和的重组人乳铁蛋白成为 > 90% 铁饱和, 导致全铁乳铁蛋白, 并且通过酸

处理去除结合的铁使 50%饱和的重组人乳铁蛋白成为< 10%铁饱和,导致缺铁乳铁蛋白。将纯化的乳铁蛋白(全铁、部分和缺铁)用作细胞培养基组分。

[0402] 实施例 5:重组血清人白蛋白(rHSA)的纯化和表征

[0403] B000 生产工艺的概述

[0404] 为了从稻米纯化 rHSA,将上文所述表达重组人血清的稻米去壳,磨成粉并且与 rHSA 提取缓冲液(乙酸钠, pH 4.9)混合 30min。在通过过滤澄清之后,以约 150cm/hr 的速率将滤液装上阴离子交换柱(Q- 琼脂糖;GE Healthcare)。一旦装上,然后用平衡缓冲液洗涤树脂以去除任何未结合的蛋白。如通过 SDS-PAGE 所分析的,洗脱的 rHSA 为约 90%纯。基于 SDS-PAGE 凝胶的扫描分析,然后 Blue- 琼脂糖(GE Healthcare)可以用于将纯度从 90%增加至约 98%。然后在冷冻干燥之前通过超滤将 rHSA 浓缩和脱盐。

[0405] 为了与 pHSA(血浆来源的 HSA)比较,对纯化的重组 HSA 进行生化和生物物理范围的表征(表 E2)。这些测试表明水稻中表达的 rHSA 与 pHSA 相当。

[0406]

表 E2 与血浆来源的白蛋白(pHSA)比较的重组白蛋白(rHSA)的特性		
特性	pHSA	rHSA
N 端序列	DAHKSE	DAHKSE
糖基化	无	无
SDS-PAGE/Western	~66 kDa	~66 kDa

[0407]

分子量 (MALDI)	66.9-68.1 kDa	66.8-67.9 kDa
等电聚焦点	pI 5.3	pI 5.3
配体结合	是	是
热稳定性	中点 65°C	中点 65°C
酯酶活性	是	是
蛋白酶敏感性	彼此相同	彼此相同

[0408] B0000C 生产工艺:对于 Ventria 生长的水稻,通过联合或手工收获水稻。在该过程期间,通过联合收割机的脱粒器或手工劳动从营养植物物质分离成熟种子。将收获的水稻干燥至约 12%含水量,在这个点其适合储存在干净的粮仓、储存手提袋、超大袋或其他容器中,保护籽粒免受鸟类、啮齿类、蜥蜴、昆虫和其他害虫侵害。当粉需要稻米时,首先将稻米去壳或脱皮。在真空下进行该过程,这样从胚乳和胚或麸皮层扫除碎片和种子的外层部分。然后将去壳的籽粒洗涤并干燥,或者洗涤并以湿的均质直接加工,或以干燥、去壳状态进一步加工。可以通过对白米生产者常见的大米抛光机或脱皮机将干燥、去壳的原料脱皮。

[0409] 可以在这个时刻洗涤脱皮、去壳的水稻并湿磨或干燥用于干磨或通过研磨成粉来直接加工。用辊磨机或针磨机,优选用最少量的剪力和热量磨。锤磨机也合适。应该磨粉,这样在水中与猛烈搅动下在不到 5 分钟内可以将蛋白提取至 90%。通常这要求小于 400 微米或 4mm 的粒径。然而,如果给出更长时间,可以提取更大的颗粒。可选地,可以洗涤籽粒并用设置的液体匀浆器湿磨,这样使 90%可提取蛋白溶解。

[0410] 通常以至少 3 份水比 1 份粉并且最多 20 份水比 1 份粉的比例混合粉浆。水通常

含有合适的缓冲液,例如 Tris/HCl、柠檬酸、磷酸盐、HEPES 或类似物,这样 pH 维持在 pH 7 左右并且少量盐,例如 100mM NaCl。在湿磨情况下浆被搅匀之后,或者对于干粉浆被完全混合之后,通过固液分离的方式从浆去除大块固体。这通过离心、离心或过滤进行;例如利用有垫的板框、加压过滤机、带式过滤机、真空瓶、水力旋流器或真空带式过滤机。过滤之后,应该用提取缓冲液洗涤压缩饼以从饼回收蛋白。加入硅藻土或其他过滤介质有利于促进滤液的澄清度,但是考虑到合适的设备这不是必需的。可选地,絮凝剂可以用于帮助澄清。应该检测澄清滤液的白蛋白含量并证实回收率与水稻种子中测定的表达水平一致。

[0411] 为了去除淀粉、可沉淀蛋白、病毒和其他污染物,将 5M 乙酸加入澄清滤液直至 pH 达到 5.0 并且溶液变白。将白色溶液搅动至少 20 分钟以促进不可溶物质的沉淀。然后通过诸如罐状过滤器 (canister filter)、筒式过滤器或其他过滤装置的厚度过滤器 (depth filter) 过滤沉淀的溶液以达到适合超滤的最佳澄清度,或者少于 10NTU (比浊法浊度单位)。还可以用压滤机、加压过滤机澄清,或者可选地,通过利用陶瓷过滤器或其他利用错流的物质。此外,该物质适合直接应用于扩张床层析柱。

[0412] 在优选方法中,澄清滤液是通过 0.2 微米过滤器过滤来澄清的,并且用 1M NaOH 中和至 pH 7.0。然后该物质适合通过中空纤维、平板或螺旋卷式错流过滤来超滤。可以使该物质通过 100 千道尔顿 (kDa) 大小或更大的膜以去除病毒、不需要的较大的污染物和团聚体。通过膜的物质可以用 10 或 30kDa 错流膜浓缩,然后相同的膜可以用于制备层析的溶液。然后可以用柱平衡缓冲液渗滤浓缩物质直到电导率和 pH 相等。

[0413] 用于在 GE DEAE 琼脂糖或 GE Q 琼脂糖上的阴离子交换层析的优选缓冲液为平衡至 pH 8.0 的 10 或 20mM Tris/HCl 缓冲液。相比之下,对于阳离子交换,例如通过使用带负电荷的树脂或与疏水性接头混合的带负电荷的树脂 (混合模式吸收剂),或者可选的诸如蓝色琼脂糖 (GE) 的蓝色 Cibicron,优选缓冲液为平衡至 4.8-5.0 的醋酸或柠檬酸缓冲液。

[0414] 对于任一系统,通过基质保留白蛋白和其他相似带电蛋白,并且通过用至少 5 个柱体积的荷载缓冲液洗涤来进行洗涤以去除松散结合的物质,在认为需要时,荷载缓冲液还可以包括去污剂以帮助去除疏水性杂质。可以通过用相同或调整的缓冲液为柱充电来洗脱该物质,关于调整的缓冲液,对于阳离子交换 pH 增加 2-4 单位或对于阴离子交换减少 2-4 单位。因而发生的 pH 变化会允许离子交换,并且蛋白会以尖锐条带洗脱。为了增加洗脱组分的纯度,可以仔细检查洗脱峰,这样第一部分 (10%) 或最后 (10%) 或者两部分可以从主洗脱峰排除。在优选方法中,用含有 100mM 磷酸盐并且将 pH 调至 pH 4.0 而且包括 10mM NaCl 的溶液从 GE Q 琼脂糖 (Fast Flow) 洗脱蛋白。在这种情况下, pH 和电导率用于洗脱物质,允许不结合污染物 (流穿和洗涤) 和更紧密结合污染物 (在 100mM 磷酸盐, 10mM NaCl 并且 pH 调至 4.0 中保留在柱上的污染物) 之间的区别。

[0415] 洗脱之后,如果洗脱物质的 pH 具有少于 6.0 的 pH,然后用 1M NaOH 将其中和。为了下一层析步骤,然后将所得溶液对相同缓冲液渗滤,在优选方法中,其包含使洗脱液流过相同基质 (即 Q 琼脂糖) 的柱,除了在具有 100mM 磷酸盐、10mM NaCl 和 pH 7.0 的不结合模式下。

[0416] 第二个柱步骤使用与第一个相同的原理但是以反向模式,这样在结合柱上共洗脱的污染物有机会保留在中性 pH 的基质上。还可以用各种可选类型的层析方法处理来自第一个捕获柱的流穿物质,例如阳离子交换、疏水、混合模式或凝胶过滤层析。

[0417] 在优选方法中,在 10kDa 或 30kDa 错流膜上浓缩来自 Q 琼脂糖不结合柱的流穿物质直到浓度在 15 和 25% 白蛋白之间。然后通过渗滤至合适的缓冲液来改变缓冲液用于细胞培养,例如 Dulbeccos PBS 或者可选的 20mM 磷酸盐、50mM NaCl 和 pH 7.0。然后将该物质无菌级过滤至无菌容器。用去污剂处理无菌过滤的物质以破坏有包膜病毒并帮助去除疏水性毒素和污染物。在优选方法中,在室温(小于 23°C 并大于 18°C)下将 0.5% v/v Triton X-114 或 X-100 加入 15-25% 白蛋白溶液,并且搅动或搅拌该溶液至少以小时计。然后使该物质通过疏水性树脂,该疏水性树脂具有远小于白蛋白分子量的分子量排阻极限。许多商购的树脂可用,包括来自 Biorad 和 Pall Corporation 的树脂。

[0418] 然后可以在对去污剂敏感的细胞中测试通过柱的物质以确认生物活性。剩下的残余去污剂通常应该少于白蛋白溶液的 0.005%。然后可以将无去污剂的流穿液无菌过滤至容器用于直接装运,或者可以加入稳定剂,或者可以使其与稳定剂接受巴氏消毒法,或者可以在于干燥之前加入稳定剂或直接干燥。可以通过冷冻干燥或喷雾干燥来干燥该物质。干燥之前,在一些实例中,利用一次性、验证的病毒去除胶囊,例如可从 GE、Pall 和 Millipore 获得的,使该物质通过病毒过滤步骤可以是有用的。本领域中普遍理解预过滤步骤可以是必需的,以便使浓缩物质有效和经济地通过 20nm 滤器。

[0419] 结果:在磷酸缓冲盐水中以 1 : 5 比例提取米粉并且混合 20 分钟。利用 Nalgene 滤瓶澄清液体。如方法中所述使随后澄清的提取物进行酸沉淀。然后将该溶液过滤并中和以给出澄清的滤液。将该物质对 50mM Tris/Cl pH 8.0 渗滤直到该物质和缓冲液平衡。然后将该物质装上 (300-600cmh) 预平衡的 GE Q- 琼脂糖柱以允许 50g/L 结合容量。用相同的缓冲液洗涤荷载的物质,然后如上文所述用 100mM 磷酸盐、10mM NaCl 和 pH 4.0 洗脱该物质。该物质以锐峰洗脱,并且收集的洗脱物具有约 5.8 的稳定 pH。将利用这种方法产生的白蛋白与其他来源的白蛋白比较,如下文更充分地公开:将洗脱物收集在池中,并且加入 1M NaOH 直到 pH 大于 6.0。然后在 10kDa 再生纤维素膜上将该物质浓缩约 5 倍,并且用 100mM 磷酸盐、10mM NaCl, pH 7.0 进行约 5 个等体积渗滤。检测最终渗滤物质的白蛋白含量(关于起始原料中的表达水平应该大于 80%)和内毒素水平(根据原料应该少于 100EU/mg)。使该物质通过 (60-160cmh) Q- 琼脂糖柱,用足够量的 100mM 磷酸盐、10mM NaCl, pH 7.0 平衡以允许约 2-3 倍上柱体积。用相同的缓冲液通过树脂洗涤该物质并收集。在 10kDa 再生纤维素膜上渗滤收集的物质并浓缩约 10 倍或直到白蛋白浓度达到至少 10% 或不超过 20%,然后用 20mM 磷酸盐、50mM NaCl, pH 7.0 进行 5 个等体积渗滤。无菌级过滤 (0.2 μ m) 之后,在 20+/-2°C 下将该溶液与 0.5% (v/v) Triton X-100 搅动 1 小时。孵育之后,根据制造商指示使该物质通过 Pall SDR 树脂。将流穿物质无菌级过滤至无菌容器并冷藏或冷冻干燥,正如对于蛋白和盐溶液所常见的。

[0420] 实施例 6 :利用 B0000C 工艺从水稻产生的重组白蛋白与其他来源的白蛋白和以往用于白蛋白生产的方法的比较

[0421] 方法:将利用实施例 5 所述工艺 B000C 制备的白蛋白与利用以前用于制备重组白蛋白的可选工艺 (B000) 制备的白蛋白比较 (Cellastim(批次 B202-B217))。

[0422] 白蛋白生产(旧工艺 B000):

[0423] 用 NaOH 将米粉和 25mM 磷酸钠、50mM 氯化钠 pH 平衡至 6.5,并且在室温下以约 1 : 10 的 S/L 比例混合 20 分钟。以 10g/L 加入助滤剂 (Cellpure 300),并且通过压滤

机、真空过滤或离心过滤浆。用 1M 乙酸将澄清的滤液酸沉淀至约 pH 5.0。加入 5g/L 助滤剂 (Cellpure 300), 如上文所述过滤所得的溶液。立即用 1M NaOH 将该物质中和至 pH 6.5-7.0。用 5 个透析体积 (diavolume) 的与提取所用相同的缓冲液渗滤该物质 (10kDa 再生纤维素用于所有 UDF 步骤)。将该物质装上预平衡的 Q- 琼脂糖柱 (GE Healthcare) 以允许在 60cmh 下 8g 白蛋白结合每升树脂。

[0424] 用 5 个柱体积的相同缓冲液洗涤柱之后, 通过将盐浓度增加至 250mM NaCl 来一步洗脱白蛋白。将所得物质对 5-7 个透析体积的 100mM 磷酸钠、10mM NaCl, pH 7.0 渗滤。使所得物质通过用 100mM 磷酸钠、10mM NaCl, pH 7.0 平衡的 Q- 琼脂糖柱, 并且收集为流穿液。然后将流穿物质浓缩并对 5 个透析体积的 20mM 磷酸钠、10mM NaCl, pH 7.0 渗滤。将最终浓缩的物质无菌过滤并与 10g/L 去污剂 CHAPS ((3- 胆酰胺丙基) 二甲氨基) 丙磺酸 ((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-Propanesulfonic Acid) 孵育和在室温下混合 1 小时。孵育 1 小时之后, 使该物质通过 Biorad SM-2 柱。将该物质无菌过滤并冷冻干燥。

[0425] 大小排阻层析分析

[0426] 在 GF-250 柱 (Agilent Technologies) 上以 1ml/min 的流速在 100mM 磷酸盐、pH 7.0 中通过 HPLC 进行纯度分析, 检测器设置 214 和 280nm。通过注射 5 个由干粉制成的不同稀释液来产生标准曲线, 因为盐和水, 修正系数为 0.92。通过保留时间或可选的基线来整合来自 214nm 的主峰。以标准注射范围之内的浓度注射未知样品。从标准曲线计算白蛋白的未知浓度每干粉重 (纯度)。在典型实验中, 以约 50 μ L 注射体积注射 0、5、8、10、15 和 20 μ g 标准品, 然后约 10 μ g 未知样品。整合峰之后标准曲线的相关系数通常在 0.98 以上。

[0427] SDS PAGE 和光密度测定法:(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)

[0428] 通过将蛋白溶液稀释至 1-2mg/ml 来制备样品, 使得加样至每个孔的每个蛋白能够有确定的量。将样品与含有还原剂 (Invitrogen NP0004) 的 Tris- 甘氨酸 SDS 样品缓冲液 (LC2673Novex) 1 : 1 混合并加热至 70°C 保持 5 分钟。将样品加样 (10、20 或 30 μ g) 至 Novex 4-20% 预制凝胶, 并且在标准 Tris- 甘氨酸-SDS 运行缓冲液中以恒压 (130V) 分离。当示踪染料到达凝胶末端时结束电泳。在第一泳道中包括分子量标记作为参考。

[0429] 用 G Bioscience (786-35G) 染色凝胶, 并且用水脱色。用 Hewlett Packard Scanner (G4010) 获得数字图像。然后用 UN-SCAN-IT (Silk Scientific Corp.) 打开图像文件。在 256 灰度中用正像分析进行光密度测定法, 其中包括所有可见条带作为单独片段。通过 4 个角点插值来校正背景噪声, 如软件中对每个片段所指定的。然后从产品的像素 # 和平均像素强度 (0-255) 计算每个片段或条带的信号。将整个泳道信号的总和 (所有可见片段或条带) 取作 100%, 并且减去杂质条带以计算白蛋白纯度。计算每个条带中每种污染蛋白的百分比作为鉴定的该污染物蛋白的肽数量, 如通过肽图谱除以特定条带中鉴定的所有肽的总数量所确定的。重复图像分析 3 次, 这样标准差少于 100% 的 0.5%。

[0430] 通过 Pyrogene rFC 方法测定内毒素

[0431] 通过 Pyrogene rFC 方法测定内毒素含量。如制造商 (Lonza) 所指定地将冻干的内毒素标准品与无内毒素水混合以产生标准曲线。对于液体稀释蛋白样品, 或者可选地, 对于粉末用无内毒素水重组。制备不同的稀释液, 这样读数应该出现在标准曲线的范围内。

将样品加热至 100℃保持 10 分钟以分离不需要的分子相互作用。在典型实验中,以 100 μ l 每孔加入样品和标准品,0、0.001、0.005、0.01、0.05 和 0.1 内毒素单位每孔。还以 100 μ l 加入样品,并且包括额外的样品,加入掺加 0.001-0.01 内毒素单位每孔的样品以测试抑制或干扰测定。根据制造商 (Lonza) 通过将 rFC 酶、测定缓冲液和底物以 1 : 4 : 5 的比例分别混合来制备工作试剂。将工作试剂以样品或标准品的等体积加入孔。设置荧光酶标仪 (Biotek FLX 800T) 在 380nm 激发 (带宽 = 20nm), 并且设置发射波长在 440nm (带宽 = 30nm)。从在 37℃下 1 小时之后所取的读数减去在时间 0 所取的读数。如果标准品的相关系数、斜率和 Y- 截距在设置限制之内,认为读数是有效的,并且掺加实验显示掺加的内毒素在设置限制内可测量和可回收。此外,重复样品的标准差应该合理的一致,这样标准差在任意选择指定的限制之内。无菌收集所有样品,并且测试所用的管 / 瓶 / 容器在良好的实验室实践之下证实是极低内毒素的,因为其涉及准确和精确的内毒素测试。

[0432] 细胞的活力的测定

[0433] 将杂交瘤细胞系 AE1 (ATCC) 维持在含有 5% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 基础培养基中。在没有补充胎牛血清的无血清条件 (AFM6, KC Bio, Kansas) 下测试白蛋白。通过多次传代将细胞从 5% FBS 继代培养至无血清培养基。在每次继代培养时,分析细胞在所示浓度白蛋白存在下的总细胞计数和活力。(如通过胰酶消化和利用 Neubauer 血细胞计数器直接计数所评价的)。使细胞在标准培养条件 (5% CO₂ 和 37℃) 下生长约 70 小时,之后测量培养物的活力。重复进行实验。数据显示被 10⁵ 除的活细胞数量 /ml。

[0434] 去污剂的测定

[0435] 通过去污剂 (基于细胞的) 测定来测定白蛋白的去污剂浓度。简单地说,向去污剂敏感细胞掺加不同量的去污剂,并且用所得的细胞的活力测定产生由 16 个独立的数据点组成的标准曲线。用对数函数绘图和拟合关于去污剂浓度变化的活力变化。然后用该方程计算在同样基于细胞的测定中测试的样品的未知去污剂浓度。所给数据的标准曲线的相关系数为 0.9816。通常大于约 10ppm 每 Cellastim 干重的去污剂浓度导致明显的有毒活性。通过 10% 白蛋白溶液中的比较,当去污剂浓度在约 100ppm-200ppm 或 0.01% -0.02% (v/v) 以上时,去污剂的毒性作用变得明显。

[0436] 结果和讨论 :

[0437] I. 通过大小排阻层析的血浆来源血清 (Sigma 白蛋白), 以及利用新工艺 (B000C) (Cellastim P0171) 和旧工艺 (Cellastim P0107) 产生的重组 HSA (Cellastim) 的分析

[0438] 三种类型白蛋白的 HPLC 大小排阻谱 (图 8A, C 和 D) 显示在总体纯度方面, 不同白蛋白制品大体上相似。具体来说, 在 4.5kDa 和 240kDa 左右处的峰为内参, 而所有三个产物均含有在约 10-12kDa 处的非常少量的非主峰信号。

[0439] 人血浆来源的白蛋白 (Sigma 白蛋白) (图 8A) 含有在 17kDa 左右处的污染物, 通过比较利用新工艺的重组水稻来源的白蛋白 (Cellastim P0171) (图 8C) 含有 44kDa 和 55kDa 的 2 个蛋白污染物, 其出现在 Cellastim 模式中, 新工艺比利用旧工艺 (Cellastim P0107) (图 8B) 时水平显著更高。在 HPLC 分离中这些峰未完全解析, 但是在 Cellastim P0171 和 Sigma 白蛋白 (图 8D) 以及图 8E 所示的利用旧工艺和新工艺制成的 Cellastim 的重叠谱可以看得更加清楚。

[0440] 对应这些峰的蛋白代表通过利用实施例 5 所述工艺产生的 Cellastim 中主白蛋白

峰的肽质量指纹分析所鉴定的所有污染物蛋白的约 5%，如下文进一步讨论的。

[0441] 所有测试的白蛋白产物还含有在 130kDa 左右处的峰，其最可能代表白蛋白二聚体，显而易见 Cellastim 二聚体峰明显小于血浆来源的白蛋白。聚集白蛋白的产生是蛋白降解的指示，其在产业内广泛用作降解或失去稳定性的一个标志。可能 Cellastim 中存在的 Hsp 促进白蛋白的解聚，因此减少二聚体的数量，因为这是 Hsp 70 和其他 Hsp 蛋白的常见功能。

[0442] II. 通过 SDS PAGE 的 Cellastim 批 P0171(新工艺)与 Millipore/Novozymes 生产的白蛋白 (Cat No. 9301-01) 的比较分析

[0443] 结果 :SDS-PAGE 分析 (图 9A 和 B) 显示在总体纯度方面产物大体上相似。图 9A 示出了 Cellastim P0171 和 Cellprime 白蛋白 (Millipore/Novozymes) 的比较。泳道 1 为分子量标记。泳道 4 为 Cellastim 白蛋白 (10 μ g) 并且泳道 7 为 Cellprime 白蛋白 (10 μ g)。图 9B 示出了通过 SDS PAGE 分析的来自以前的工艺 (B000) (泳道 2、3 和 4) 和新 Cellastim 工艺 (B0000C) (泳道 6、7 和 8) 的 3 批 Cellastim 的比较。将 6 个样品以 20 μ g 每泳道加样。

[0444] 凝胶的视觉检测显示满足更严格规范的新工艺在测试的 3 批之间更一致。(图 9B, 泳道 2、3、4 vs. 泳道 6、7、8)。与新工艺相比，来自以前的工艺的 3 个样品之间带型显著不同。重要地，新工艺样品在 250KDa 处具有比旧工艺样品所具有的显著更少的团聚体。(对于旧工艺平均大于 2%，并且对于新工艺平均小于 1%)。利用新工艺所产生的 Cellastim 中富集的蛋白污染的相同性在下文进一步讨论。

[0445] III. 旧批和新批 Cellastim 的内毒素、去污剂和生长促进能力的分析。用于制备不同的几批白蛋白的两种不同工艺的性能比较 (表 E3 和 E4) 证实与实施例 5 所述新工艺相比，旧工艺产生含有显著更多内毒素和去污剂的重组白蛋白，并且导致显著增强细胞的活力的产物

[0446]

表 E3 Cellastim –旧工艺 B000

生产日期	批号	克产物	EU/mg 干物质	去污剂 (ppm)	活力(活细胞数/ml/10 ⁵)			
					1mg/ml	2 mg/ml	5 mg/ml	10/mg ml
2/27/08	B202	70.6	25.3	815.3	15	7.9	4.1	0.9
2/27/08	B203	58.8	23.1	267.7	15.8	12.4	6.5	4.1
2/28/08	B204	59.9	29.2	589.2	16.3	11.1	5.2	2.9
2/28/08	B205	63	64.3	133.4	14	11.6	6.9	3.8
3/3/08	B206	41.1	35.1	1182.2	14.9	2.3	0.0	0.0
3/3/08	B207	94.2	28.7	388	16.5	12.7	7.6	4
3/4/08	B208	24.5	>80	467.2	15.3	11.4	7.1	2.7
3/4/08	B209	66.1	91.8	406.4	16.7	15.2	6.9	4.1
3/4/08	B210	87.3	67.8	76.4	17.5	19.1	15.4	8.5
3/11/08	B217	62.09	4.4	127.3	16.7	18.7	13.2	6.6
平均值			44.97	445.31	15.87	12.24	7.29	3.76

表 E4 Cellastim –新工艺 B0000C

生产日期	批号	克产物	EU/mg 干物质	去污剂 (ppm)	活力(活细胞数/ml/10 ⁵)			
					0.5mg/ml	2 mg/ml	5 mg/ml	10/mg ml
2/2/2009	B0032C	209.4	0.35	3.1	13.1	15.7	13.4	11.2
2/2/2009	B0033C	271.4	0.26	7.9	18.4	17.4	15.1	14.3
2/10/2009	B0041C	247.1	0.18	5.4	15.4	17.2	14.1	12.1
4/27/2009	B0118C	617.4	0.11	小于 1	15.7	15.4	19.2	16.8

[0447]

5/14/2009	B0138C	610.6	0.48	小于 1	12.5	15.8	15.1	14.6
6/9/2009	B0158C	598.0	0.13	3.9	13.7	17.1	13.2	11
6/15/2009	B0162C	618.6	0.20	2.0	15.5	17.5	17.2	14.7
7/28/2009	B0196C	507.0	0.36	3.9	17.4	17.3	18.8	14.8
8/26/2009	B0219C	851.4	0.86	8.2	17.9	16.3	16.6	13.7
8/31/2009	B0220C	897.8	0.93	小于 1	13.5	16	15.5	15.1
9/9/2009	B0227C	929.9	0.13	小于 1	11.1	14.4	12.5	11.4
平均值			0.36	3.45	14.92	16.37	15.52	13.6

[0448] 讨论：重改造旧工艺以创造实施例 5 所述新工艺导致总体产物纯度和性能的显著变化，如下文更充分地描述。

[0449] 变化使得可以制备去污剂更低、内毒素更低并且纯度增加的产物。具体来说，新工艺常规产生具有大于约 95% 的总体纯度的重组白蛋白。相比之下，旧方法常规产生具有约 90% 的最大纯度的白蛋白。出人意料地，尽管产物纯度增加，工艺中的这些变化还导致热休克蛋白与重组白蛋白的共纯化增加（参见下文）。没有被任何特别的操作理论限制，据认为高白蛋白纯度、相对缺少内毒素和 / 或去污剂以及热休克蛋白的共纯化的组合导致了显著优于以前用于制备白蛋白的方法的产物。

[0450] 具体来说，表 E3 和 E4 证实用于产生重组白蛋白的新工艺导致了产物，例如在 5mg/ml，导致了平均逐批细胞的活力提高 100%（在 5mg/ml），并且还导致了比旧工艺平均少 100 倍内毒素和少 100 去污剂的产物。

[0451] 实施例 7 :对细胞生长和活力影响的分析

[0452] 为了比较上文制备的重组白蛋白与其他商购白蛋白产品的细胞生长促进能力,在细胞生长和活力测定中并排比较不同来源的白蛋白。测试的 3 个产品为 (Cellastim, Lot#P0153)Cellprime 白蛋白 (Millipore/Novozymes Cat No. #9301-01) 和血浆来源的白蛋白 (Seracare Cat No. #HS-400-60)。

[0453] 方法 :将特别条件的杂交瘤细胞 AE1 以 0.5×10^5 个细胞每 ml 培养基的密度接种在 DF12/ITSE 中,之后用相同培养基洗涤两次以去除残余培养基。然后按照图例所示浓度将培养基和细胞不处理 (阴性对照),用 Seracare 白蛋白处理、用 Cellprime 白蛋白处理和用水稻来源的重组白蛋白处理。使细胞在标准培养条件 (5% CO₂ 和 37℃) 下生长约 70 小时,之后测量培养物的活力。重复进行实验。结果如图 10 所示。

[0454] 结果 :Novazyme's Cellprime 白蛋白引起活力丧失 (交叉影线柱)。Seracare 白蛋白 (白色柱) 引起活力可测量的增加,但是没有用新工艺在水稻中制备的重组白蛋白 (Cellastim) 所见到的增加 (黑色柱) 那么大。在这些条件下,在任何测试的浓度,与任何其他白蛋白产品相比,水稻来源的重组白蛋白在促进细胞的活力中的活性是约 5 倍。条纹柱代表阴性对照。

[0455] 讨论 :考虑到其他商购白蛋白产品可以具有与水稻来源重组白蛋白相似的总体纯度、内毒素和去污剂的可能性,重组水稻来源白蛋白与其他商购白蛋白相比显著优越的性能提示与血浆来源的白蛋白相比在 Cellastim 中鉴定的以前未鉴定的蛋白污染物 (实施例 5) 可以对细胞的活力具有积极影响。为了鉴定然后表征这些蛋白对 Cellastim 特性的影响,如下文所述,对重组白蛋白样品进行肽质量指纹分析。

[0456] 实施例 8 :重组人血清白蛋白的肽质量指纹分析

[0457] 方法 :利用 NanoLCMS/MS 肽测序系统 (ProtTech, Inc.) 分析白蛋白样品以测定重要的蛋白污染物,并且利用专有软件基于肽片段的分子量鉴定蛋白。简单地说,通过 SDS-PAGE 分析白蛋白样品,然后将每条主要条带凝胶条带脱色、清洁并用测序级修饰的胰蛋白酶在凝胶内消化。通过 LC-MS/MS 系统分析所得的肽混合物,其中使用具有 75 微米内径反相 C18 柱的高压液相层析 (HPLC) 串联离子阱质谱仪。用 ProtTech's 专有软件套装将获得的质谱数据用于搜索最新的无冗余蛋白数据库。报道之前人工验证了来自数据库搜索的输出。

[0458] 结果 :经过 3 个代表性批次重组白蛋白的测试,通过肽质量指纹分析鉴定了 3 个 Hsp70 蛋白 (表 E5)。将鉴定的 3 个特定序列 :ABF95267、ABA97211 和 BAD 07938 与无冗余数据库比较以找到高度相关和同源蛋白。来自这些比较的每一个的最高命中结果如下文表 E6、E7 和 E8 所示。

[0459]

表 E5 通过质量指纹分析从 Cellastim 鉴定的肽	
序列	肽
ABF95267	ATAGDTHLGGEDEFDNRVVPGPADKSPMIVVTYKGEEK NAVITVPAYFN DSQRIINEPTAAAIAYGLDKK (SEQ. ID. No. 2)
AAB63469 BAD07938 BAD07713	NQAAVNPER NGHVEIIANDQGNRIVNKDGKPYIQVK IINEPTAAAIAYGLDKK KLGTVIGIDLGTITYSCVGVYK VEIESLFDGTDSFSEPLTR (SEQ. ID. No. 3)

[0460]

ABA97211	NQADSVVYQTEK KQDITITGASTLPKDEVERDVVLLDVTPLSLSLGLET LGGVMTK (SEQ. ID. No. 4)
----------	--

[0461] 在 Genbank[®] 蛋白序列无冗余数据库 (Nucleic Acids Research, 2008 Jan ; 36(Database issue) :D25-30) 中与 ABF95267 序列进行序列比较的结果如下文表 E6 所示 :

[0462]

表 E6
与 ABF95267 产生显著对齐的序列:

基因 Ref	基因描述	(位)	值
ref NP_001140835.1	hypothetical protein LOC100272911 [Zea ma...	79.7	8e-14
ref XP_002465468.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g039390...	79.7	9e-14
ref NP_001049719.1	Os03g0277300 [Oryza sativa (japonica cult...	79.7	9e-14
gb ACJ54890.1	heat shock protein 70 [Oryza sativa Japonica G..	79.7	9e-14
Sp P09189.1	HSP7C_PETHY RecName:Full=Heat shock cognate 70 k...	77.0	5e-13
emb CAA31663.1	hsp70 (AA 6 - 651) [Petunia x hybrida]	77.0	5e-13
ref XP_002312089.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	77.0	5e-13
sp P24629.1	HSP71_SOLLC RecName:Full=Heat shock cognate 70 k...	77.0	5e-13
gb AAB99745.1	HSP70 [Triticum aestivum]	76.6	6e-13
gb AAB42159.1	Hsc70 [Lycopersicon esculentum]	76.6	7e-13
gb ACD45076.1	heat-shock protein 70 [Dactylis glomerata]	76.3	8e-13
ref XP_002512741.1	heat shock protein, putative [Ricinus com...	75.9	1e-12
ref XP_002512742.1	heat shock protein, putative [Ricinus com...	75.9	1e-12
gb AAA82975.1	PsHSP71.2 >emb CAA67867.1 heat shock protein ...	75.9	1e-12
gb AAS09825.1	heat shock cognate protein 70 [Thellungiella h...	75.9	1e-12
emb CAA44820.1	heat shock protein 70 [Nicotiana tabacum]	75.5	2e-12
ref NP_001055754.1	Os05g0460000 [Oryza sativa (japonica cult...	75.5	2e-12
ref NP_001051724.1	Os03g0821100 [Oryza sativa (japonica cult...	75.1	2e-12
ref XP_002456611.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g039360...	75.1	2e-12
ref NP_001044757.1	Os01g0840100 [Oryza sativa (japonica cult...	75.1	2e-12
gb ACR35910.1	unknown [Zea mays]	75.1	2e-12
ref XP_002284017.1	PREDICTED:similar to HSC70-1 (heat shock...	75.1	2e-12
ref XP_002532297.1	heat shock protein, putative [Ricinus com...	75.1	2e-12
ref XP_002284008.1	PREDICTED:similar to HSC70-1 (heat shock...	75.1	2e-12
ref XP_002283532.1	PREDICTED:similar to HSC70-1 (heat shock...	74.7	3e-12
ref XP_002332067.1	predicted protein [Populus trichocarpa]	74.7	3e-12
gb AAF34134.1	high molecular weight heat shock protein [Malu...	74.7	3e-12
gb EEC76425.1	hypothetical protein OsI_14101 [Oryza sativa I...	74.7	3e-12
ref XP_002316294.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	74.7	3e-12
ref XP_002283516.1	PREDICTED:similar to HSC70-1 (heat shock...	74.3	3e-12
ref XP_002441219.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_09g022580...	74.3	4e-12

[0463] ABB63469 与 GenBank® 蛋白序列无冗余数据库中序列进行序列比较的结果如下文表 E7 所示:

[0464]

表 E7 与 AAB63469 产生显著对齐的序列:			
基因 Ref	基因描述	(位)	值
emb CAP31983.1 	C. briggsae CBR-HSP-4 protein [Caenorhabditis...	<u>50.1</u>	7e-05
dbj BAG60366.1 	unnamed protein product [Homo sapiens]	<u>49.7</u>	8e-05
ref YP_002421952.1 	chaperone protein DnaK [Methylobacterium ...]	<u>49.7</u>	9e-05
ref YP_001640420.1 	chaperone protein DnaK [Methylobacterium ...]	<u>49.7</u>	9e-05
ref NP_001105893.1 	Binding protein homolog1 precursor [Zea m...	<u>49.3</u>	1e-04
gb AAA62325.1 	HSP70	<u>49.3</u>	1e-04
ref YP_001756576.1 	chaperone protein DnaK [Methylobacterium ...]	<u>49.3</u>	1e-04
gb AAB63469.1 	endosperm lumenal binding protein [Oryza sativa]	<u>49.3</u>	1e-04
ref YP_001925829.1 	chaperone protein DnaK [Methylobacterium ...]	<u>49.3</u>	1e-04
ref NP_001105894.1 	Binding protein homolog2 precursor [Zea m...	<u>49.3</u>	1e-04
gb ACF86491.1 	unknown [Zea mays]	<u>49.3</u>	1e-04
ref NP_001045675.1 	Os02g0115900 [Oryza sativa (japonica cult...	<u>49.3</u>	1e-04
ref ZP_02191025.1 	Molecular chaperone [alpha proteobacterium...	<u>49.3</u>	1e-04
ref XP_001701685.1 	binding protein 1 [Chlamydomonas reinhard...	<u>48.5</u>	2e-04
ref XP_001701884.1 	binding protein 2 [Chlamydomonas reinhard...	<u>48.5</u>	2e-04
emb CAC37635.1 	luminal binding protein, BiP [Scherffelia dubia]	<u>48.1</u>	3e-04
gb AAM93256.1 	heat shock protein 70-C [Heterodera glycines] ...	<u>48.1</u>	3e-04

[0465] 序列ABA97211与GenBank[®]蛋白序列无冗余数据库中的序列进行序列比较的结果如下文表 E8 所示:

[0466]

表 E8 与 ABA97211 产生显著对齐的序列			
基因 Ref	基因描述	(位)	值
gb AAK13022.1 	heat shock protein 70 [Fibrobacter succinogene...	<u>44.3</u>	0.004
ref XP_002442079.1 	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g009580...	<u>44.3</u>	0.004
gb EEC69073.1 	hypothetical protein OsI_37938 [Oryza sativa L...	<u>44.3</u>	0.004
ref XP_001752769.1 	predicted protein [Physcomitrella patens ...]	<u>44.3</u>	0.004
ref NP_001066486.1 	Os12g0244100 [Oryza sativa (japonica cult...	<u>44.3</u>	0.004
gb ACT65562.1 	70 kDa heat shock protein [Triticum aestivum]	<u>43.9</u>	0.005
ref NP_001152528.1 	stromal 70 kDa heat shock-related protein...	<u>43.9</u>	0.005
gb ACN31310.1 	unknown [Zea mays]	<u>43.9</u>	0.005
ref XP_001772650.1 	predicted protein [Physcomitrella patens ...]	<u>43.9</u>	0.005
ref NP_001146752.1 	hypothetical protein LOC100280354 [Zea ma...	<u>43.9</u>	0.005
gb ABP65327.1 	chloroplast heat shock protein 70 [Pennisetum ...]	<u>43.9</u>	0.005
gb AAO72585.1 	heat shock-related protein [Oryza sativa (japo...	<u>43.5</u>	0.007
ref YP_001740846.1 	Chaperone protein dnaK (Heat shock protei...	<u>43.5</u>	0.008
ref ZP_03728467.1 	chaperone protein DnaK [Dethiobacter alkal...	<u>43.1</u>	0.009

[0467] 讨论:肽质量指纹分析鉴定了与白蛋白共纯化的3个水稻热休克蛋白超家族成员,2个水稻HSP70基因(gb|ACJ54890.1|)、EEC69073和AAB63469-来自水稻胚乳组织的BiP同系物(胚乳管腔结合蛋白)。这些基因编码的完整氨基酸序列如下文所列:

[0468] 发现基因 gb|ACJ54890.1|heat shock protein 70 [Oryza sativa Japonica

Group]HSP70 存在于 Cellastim 重组白蛋白中,约 0.07% wt/wt。其完整氨基酸编码序列 (SEQ. ID. No. 5) 如下文所提供:

```
[0469]  MAGNKGEIPA IGIDLGTYS CVGVWQHDRV EIIANDQGNR TTPSYVAFTD TERLIGDAAK
[0470]  NQVAMNPTNT VFDKRLIGR RFSDPSVQAD MKMWPFKVVP GPADKPMIVV TYKGEEKKFS
[0471]  121 AEEISSMVL T KMKEIAEAF STTIKNAVIT VPAYFNDSQR QATKDAGVIS GLNVMRIINE
[0472]  181 PTAAAIAYGL DKKAASSTGEK NVLIFDLGGG TFDVSILTIE EGIFEVKATA GDTHLGGEDF
[0473]  241 DNRMVNHFVQ EFKRKHKKDI TGNPRALRRL RTACERAKRT LSSTAQTIE IESLYEGIDF
[0474]  301 YATITRARFE ELNMDLFRRC MEPVEKCLRD AKMDKAIHD VVLVGGSTRI PKVQQLQDF
[0475]  361 FNGKELCKSI NPDEAVAYGA AVQAAILSGE GNQVRQDILL LDVTPLSLGL ETAGGVMTVL
[0476]  421 IPRNTTIPTK KEQVFSTYSN NQPGVLIQVY EGERTRTKDN NLLGKFELTG IPPAPRGVPPQ
[0477]  481 INVTFDIDAN GILNVSADK TTGKKNKITI TNDKGRSLKE EIERMVQEA E KYKAEDEQVR
[0478]  541 HKVEARNALE NYAYNMRNTV RDEKIASKLP ADDKKKIEDA IEDAIKWLDG NQLAEADEFE
[0479]  601 DKMKELESLC NPIISKMYQG GAGGPAGMDE DAPNGSAGTG GSGAGPKIE EVD
```

[0480] 发现 AAB63469, 来自水稻胚乳组织 (胚乳管腔结合蛋白 [水稻]) BiP 的 BiP 同系物存在于 Cellastim 重组白蛋白中,约 0.09% wt/wt。其完整氨基酸编码序列 (SEQ. ID. No. 6) 如下文所提供:

```
[0481]  mdrvrgsaf l gvl lagsl f afsvakeet k lgtvigidl gttyscvgyv knghveian
[0482]  dqgnritpsw vaftdserli geaaknqaav npertifdvk rdigrkfeek evqrdmklvp
[0483]  121 ykivnkigkp yiqvkikdge nkvfspeevs amilgkmet aeaylgkkin davvtvpayf
[0484]  181 ndaqrqatkd agviaglnva riineptaaa iaygldkkgg eknilyfdlg ggtfdvsilt
[0485]  241 idngvfevla tngdthlgge dfdqrimyf iklikkkysk diskdnralg klrreaerak
[0486]  301 ralsnqhqr veieslfdgt dfsepltrar feelnndlfr ktmgpvkkam ddagleksqi
[0487]  361 heivlvvgst ripkvqllr dyfegkepnk gvnpeavay gaavqgsils geggdetkdi
[0488]  421 llldvapltl gietvggvm kliprntvip tkksqvftty qdqqttsiq vfegersmtk
[0489]  481 dcrl l gkfdl sgipaaprgt pqievtfevd angilnvkae dkgtgkseki titnekgrls
[0490]  541 qeeidrmvre aeefaeedk vkeridarnq letyvynmkn tvgdkdklad kleseekek
[0491]  601 eealkealew ldenqtaeke eyeeklkve avcnpiisav yqrtggapgg rrrgrlddeh
[0492]  661 del
```

[0493] 发现 EEC69073/OsI_37938 [Oryza sativa Indica Group], 基质 HSP70 存在于 Cellastim 重组白蛋白中,约 0.06% wt/wt。其完整氨基酸编码序列 (SEQ. ID. No. 7) 如下文所提供:

```
[0494]  masftsqlga macgaapsts plaarrsgql fvgrkpaaas vqmrpvpragr argvamrvac
[0495]  61 ekvvgidlgt tnsavaameg gkptvitnae gqrttpsvva ytkggerlvq qiakrqavvn
[0496]  121 pentffsvkr figrkmaevd deakqvsyvh vrddngnvkl dcpaigkqfa aeaisaqvlr
[0497]  181 klvddaskfl ndkitkavvt vpayfndsqr tatkdagria glevlriine ptaaslaygf
[0498]  241 ekknnetilv fdlggtfdv svlevgdgvf evlstsgdth lggddfdkfy fcwvfyfgam
[0499]  301 thetpkvvdw lasnfkkdeg idllkdkqal qlrteaaeka kmelstlsqt nislpfitat
[0500]  361 adgpkhiett lsrakfeelc sdlidrlktp vtналrdakl svdnldevil vggstripsv
[0501]  421 qelvkkitgk dpnvtvnpde vvs lgaavqg gvlagdvkdv vlldvtpsl gletlvgvmt
```

[0502] 481 kiiprnttlp tsksevfsta adgqtsvein vlqgerefvr dnkslgsfrrl dgippaprgv
[0503] 541 pqievkfdid angilsvaaai dkgtgkkqdi titgastlpk devermveea dkfaqedkek
[0504] 601 rdaidtknqa dsvvyqtekq lkelgdkvpa pvkekvdakl nelkeaiagg stqsmkdama
[0505] 661 alneevmqig qamynqqpna gaagptpgad agptssggkg pndgdvidad ftdsn

[0506] 因为在新批次水稻重组白蛋白中这些蛋白仅以相对白蛋白低的水平存在,确定这些污染物的确是造成新批次重组白蛋白优越的生长促进效果的原因的首要条件是确认将这些组分加回重组白蛋白是否恢复或增强重组白蛋白的生长促进活性,活性水平与 Cellastim 中每种组分实际鉴定的水平可比。

[0507] 实施例 9 :通过亲和层析从重组白蛋白分离热休克蛋白

[0508] 方法 :将利用新工艺产生的 Cellastim[批次 P0153、P0156 和或 P0171] 粉末与纯净水混合,约 20g/L。将所得溶液对 50mM Tris/Cl、pH 7.0 渗滤,用至少 5 个等体积缓冲液。使所得溶液通过 ATP 琼脂糖柱,并且将所得流穿液标记为部分 A。用 5 个柱体积的平衡缓冲液洗涤柱,并且用 50mM Tris/Cl、1M KCl, pH7.0 洗脱结合至 ATP- 琼脂糖的物质。将洗脱的物质标记为部分 B。将洗涤液保留为部分 C。将部分 A 直接浓缩至 100g/L 并用 d-PBS 渗滤。将部分 B 显著浓缩在 50mM Tris/Cl 中,多达 20 或 100 倍,用于进一步分析。保留洗涤液部分 C 用于进一步参考。为了蛋白印迹,将 10 μ g 的每个蛋白部分(通过 A280,白蛋白的 e. c. (消光系数)为 0.53cm²/mg 并且 Hsp70 的 e. c. 为 0.41cm²/mg)在 2X SDS 加样缓冲液中加样至 4-20% SDS PAGE 凝胶。加样之前将样品加热至 80℃维持约 5 分钟。在 200V(恒压)下进行分离并且跑约 90 分钟。将所得凝胶在水中漂洗 30 分钟至 2 小时,然后以 30mA(恒流)将蛋白转移至硝酸纤维素膜 2 小时。所得的印迹含有分子量标记蛋白作为转移对照,然后在水中的 5% (w/v) 奶粉中封闭。将第一单克隆抗体(小鼠抗牛 Hsp70(Sigma/Aldrich#H5147))加入 5% 奶溶液至印迹(1 : 2500),并且在 4℃下将印迹在摇床上温和摇动孵育过夜。然后将印迹在 TDN 中洗涤 4 次,每次 10 分钟,加入以 1 : 2500 稀释的 5% 奶溶液中的第二抗体(Pierce 抗小鼠 HRP 缀合的)。在 4℃下孵育 2-3 小时之后,用 TDN 将印迹洗涤 4 次,每次 10 分钟。然后将所得印迹与微微(Pierce)化学发光底物孵育 5 分钟。在暗室中将 Kodak 感光胶片曝光至印迹,并且将随后的胶片显影、漂洗、固定、漂洗和干燥。为了确定分子量标记转移到胶片上的准确位置,使用发光标记。

[0509] 结果 :结果如图 11 所示。图片所示的蛋白印迹显示在 A(流穿)和 B(ATP 结合)部分中分离方法产生了 2 个蛋白群。测试了起始原料(泳道 2)、部分 A 流穿液(泳道 3)、部分 C 洗涤液(泳道 4)和部分 B(泳道 5)与单克隆抗体反应的能力。此外,将用作阳性对照的商购 Hsp70 蛋白加样在最后泳道(泳道 10)。如图 11 中印迹所示,流穿部分 A(泳道 3)不含有大量 Hsp70。如印迹所示,洗脱和浓缩部分 B(泳道 4)与抗体高度相关,并且显示至少 2 条在中间 75kDa 分子量标记左右的清晰条带。洗涤部分 C(泳道 5)显示存在跑在略低于 75kDa 处的 2 条条带。在单独独立实验中,流穿部分(泳道 7)仍然不与抗体反应,并且洗涤部分 C(泳道 8)也不与抗体反应,但是泳道 9 所示的富含 ATP 结合蛋白的部分(部分 B)给出与第一次分离所见相同的带型。

[0510] 讨论 :基于其结合至 ATP 琼脂糖亲和树脂的能力开发了分离方案以分离 HSP70 蛋白,并且测试其效果。该方法仅包括最小样品操作,仅利用 ATP 琼脂糖,和利用超滤以浓缩和进行缓冲液变化,以及利用抗 hsp70 抗体以检测 hsp 的存在。该方法的结果(图 11)清楚

证实在 10 μ g 起始原料、10 μ g 流穿部分或 10 μ g 洗涤部分中的 hsp70 不足以通过 ant-Hsp 抗体检测。相比之下,从 ATP 琼脂糖柱洗脱的部分含有至少 2 种被抗 Hsp70 抗体清楚识别的蛋白。因此结果显示该分离方法是成功的,并且在 2 次独立的层析运行和渗滤上是可重现的。此外,该数据充实了如较早讨论的肽质量指纹分析所做的热休克蛋白鉴定,而且证实这些蛋白是有功能的并且可以很容易地通过简单的 ATP 琼脂糖层析然后渗滤来分离和富集。结论是热休克蛋白与重组白蛋白共纯化。这样的共纯化与热休克蛋白结合至白蛋白以及白蛋白发挥作用将热休克蛋白稳定在稳定构象中的假设一致。出人意料地,重组白蛋白/热休克蛋白复合物保留了与功能热休克蛋白的存在一致的显著腺苷三磷酸酶活性(数据未示出)。如下文所述,该增加的活性被进一步证实提供了生长促进效果。

[0511] 实施例 10 :从水稻重组白蛋白去除 Hsp 对细胞的活力的影响

[0512] 方法 :实施例 9 所述的分离方法还用于产生适合细胞培养测试的部分 A(图 12)。该方法涉及部分 A 的最小操作,使其流穿 ATP 琼脂糖柱,然后通过渗滤浓缩并用适合细胞培养的 PBS 缓冲。该方法的意图是不将新变量引入实验,以避免观察到活力丧失,但是是由于去除 ATP 结合蛋白之外的一些其他原因或理由。对照纯粹对照(起始原料)测试部分 A 促进杂交瘤细胞培养物活力的能力。测试结果如图 12 所示。

[0513] 结果 :如图 12 所示,在相同浓度下测试 Cellastim 起始原料(交叉影线柱)和部分 A(实心柱),并且与阴性对照(条纹柱)比较。在所有 4 个测试浓度下均可观察到统计学上的显著减少。该结果显示在 ATP 琼脂糖处理之后 Cellastim 的性能有显著损失。与去除 ATP 结合蛋白之前的 Cellastim 相比,该处理导致 28.0、21.7、26.7 和 79.5% 的损失。在这个实验中,小心设计和操作样品以保证最小化由于样品操作或偶然引入新污染物所引起的性能的任何疏忽损失。

[0514] 讨论 :细胞培养结果(图 12)证实简单地使其通过 ATP 结合柱可以降低水稻来源重组白蛋白的性能。这个数据与实施例 9 所示结果组合时,证实通过 ATP 琼脂糖柱从白蛋白消耗 hsp 直接降低了白蛋白的细胞生长促进特性。因此这个结果证实白蛋白的优越特性至少部分由白蛋白中污染的热休克蛋白引起。

[0515] 实施例 11 :水稻来源重组人血清白蛋白与乳铁蛋白在无血清培养中对 CHO K1 增殖的影响

[0516] 为了研究当与其他细胞培养组分组合添加时,植物来源人血清白蛋白(Cellastim)的特有属性是否可以正面影响这些组分的生长促进活性,设计了一系列额外的实验以评价和鉴别这样的组分的最佳组合。

[0517] 方法 :将 CHO K1 系 DP12 克隆 1934(ATCC#CRL-12445)维持在补充了 0.5% FBS、1 μ M 氨甲喋呤、50 μ g/mL 青霉素/链霉素、1mM Glutamax(Invitrogen)的 SAFC 325PF 无蛋白 CHO 培养基中,在 125ml 瓶的 14ml 培养基中。CHO K1 系 DP12 表达人源化单克隆抗体作为分泌产物。检测了植物来源重组人血清白蛋白(rHSA)(实施例 3 和 5)和植物来源重组乳铁蛋白(rLF)(实施例 1 和 4)单独或组合的生长和生产力提高效果。将细胞在含有 200nM 氨甲喋呤、50 μ g/mL 青霉素/链霉素的 325PF CHO 培养基中洗涤 2 次,并且以 1.5×10^5 个细胞/ml 接种在相同培养基中至 4ml 振荡分批培养物。向 4ml 振荡培养物进一步补充各种浓度的 rHSA 或 rLF 或这两种添加剂的各种混合物。将未加入 rHSA 或 rLF 的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。在 14 天批周期通过 Guava PCA 细胞计数器(Guava

Technologies) 每天测定活细胞浓度。培养 6 天后通过细胞的相对增殖判断对数生长期。使所有培养物在 37℃、6% CO₂ 下在加湿环境中生长。按照净活细胞浓度计算观察效果(所观察的基础培养基)。按照单独组分效果的总和计算预测效果。

[0518] 表 E9 示出了培养 6 天后活细胞的数量。在无补充物的培养基中细胞增殖至 3.3×10^5 个活细胞/ml。加入植物来源重组人血清白蛋白(rHSA)或重组乳铁蛋白(rLF)或这两种的组合增加了细胞的增殖,如下文所示。第 2 列示出了各个添加剂在基线对照培养物以上的观察效果。第 3 列示出了预测效果,其利用预测添加剂效果等于添加剂 1 和添加剂 2 的总和的模型。

[0519]

表 E9				
	活细胞 (e ⁵)/ml	观察效果	预测效果	乳铁蛋白与白 蛋白的比例
无添加剂(基线)	3.3	0		
rHSA 0.5 g/L	7.3	4.0		

[0520]

rHSA 1 g/L	7.9	4.6		
rLF 0.1 g/L	7.5	4.2		
rLF 0.8 g/L	16.0	12.7		
rLF 0.1 g/L + rHSA 0.5 g/L	18.9	15.6	8.2	1:5
rLF 0.8 g/L + rHSA 0.5 g/L	29.0	25.7	16.7	1:0.625
rLF 0.1 g/L + rHSA 1 g/L	23.6	20.3	8.8	1:10
rLF 0.8 g/L + rHSA 1 g/L	35.4	32.1	17.3	1:1.25

[0521] 讨论:乳铁蛋白是无血清细胞培养基的基本要素,其发挥作用转运铁;此外最近乳铁蛋白在一些细胞类型中被鉴定为生长因子和细胞凋亡抑制因子(Huang et al., In vitro Cell.Dev.Biol.Anim. (2008) 44(10) 464-71;Wong et al., Rheumatology 48(1) 39-44;Bi et al., Arch. Immunol. Ther. Exp. (1997) 45(4) 315-20;Hashizume et al., Biochem. Biophys. Acta. (1983) 763(4) 377-82)。在表 E9 中,数据显示加入 0.1g/L 和 0.8g/L 重组乳铁蛋白导致与细胞生长基线速率相比细胞生长显著提高,与乳铁蛋白生长刺激特性一致。

[0522] 加入植物来源重组人血清白蛋白进一步增强了乳铁蛋白的生长刺激效果。出人意料地,0.1g/L 乳铁蛋白和 0.5g/L 植物来源重组人血清白蛋白(1 比 5 的比例)的组合导致刺激细胞生长,其比在相同浓度下测试的单独白蛋白或单独乳铁蛋白高约 4 倍。而 0.1g/L 乳铁蛋白和 1.0g/L 人血清白蛋白(1 比 10 的比例)导致刺激细胞生长,其比在相同浓度下单独白蛋白或乳铁蛋白高约 4.4 至几乎 5 倍。

[0523] 当将植物来源重组人血清白蛋白加入浓度为 0.8g/L 的乳铁蛋白时也观察到协同作用。甚至在这个显著更高的浓度,加入植物来源重组人血清白蛋白进一步增加了细胞生长 2-2.5 倍。

[0524] 白蛋白和乳铁蛋白是不同的蛋白家族,具有很少重叠的结构或功能相似性。因此基于其不同的结构和功能,观察到这些蛋白的协同作用这一事实是意外的。协同作用提供

了开发改进补充物的机会,其通过利用乳铁蛋白和白蛋白的最佳比例来提供具有增强的细胞培养特性(即提高的细胞生长和活力)的补充物。

[0525] 实施例 12:水稻来源重组白蛋白与乳铁蛋白组合对无血清培养中生长的 CHO K1 细胞生产力的影响

[0526] 方法:将 CHO K1 系 DP12 克隆 1934(ATCC#CRL-12445) 维持在补充了 0.5% FBS、 $1\mu\text{M}$ 氨甲喋呤、 $50\mu\text{g/mL}$ 青霉素/链霉素、 1mM Glutamax(Invitrogen) 的 SAFC 325PF 无蛋白 CHO 培养基中,在 125ml 瓶的 14ml 培养基中。CHO K1 系 DP12 表达人源化单克隆抗体作为分泌产物。检测了植物来源重组人血清白蛋白(rHSA)(实施例 3 和 5)和植物来源重组乳铁蛋白(rLF)(实施例 1 和 4)单独或组合的生长和生产力提高效果。在含有 200nM 氨甲喋呤、 $50\mu\text{g/mL}$ 青霉素/链霉素的 325PF CHO 培养基中将细胞洗涤 2 次,并且以 1.5×10^5 个细胞/ml 接种在相同培养基中至 4ml 振荡分批培养物。向 4ml 振荡培养物进一步补充各种浓度的植物来源重组人血清白蛋白或 LF 或这两种添加剂的各种混合物。未加入 HSA 或 LF 的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。在 14 天批周期通过 Guava PCA 细胞计数器(Guava Technologies)每天测定活细胞浓度。培养 6 天后通过细胞的相对增殖判断对数生长期。当细胞的活力下降至 $< 10\%$ (通常第 13 或 14 天)时,在分批培养结束时通过定量 ELISA 测定抗体生产力(Bethyl Laboratories)。使所有培养物在 37°C 、 $6\% \text{CO}_2$ 下在加湿环境中生长。按照净活细胞浓度计算观察效果(所观察的基础培养基)。按照单独组分效果的总和计算预测效果。

[0527]

表 E10				
	产物浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	观察效果	预测效果	HSA 与乳铁 蛋白的比例
无添加剂(基线)	47.1	0		
rHSA 0.5g/L	114.6	67.5		
rHSA 1g/L	136.1	89.0		
rLF 0.1g/L	91.9	44.8		
rLF 0.8 g/L	138.5	91.4		
rLF 0.1g/L + rHSA 0.5g/L	183.7	136.6	112.3	1:5
rLF 0.8g/L + rHSA 0.5g/L	242.1	195.0	158.9	1:0.625
rLF 0.1g/L + rHSA 1g/L	219.3	172.2	133.8	1:10
rLF 0.8g/L + rHSA 1g/L	260.2	213.1	180.4	1:1.25

[0528] 表 E10 示出了单子叶植物细胞中产生的植物来源重组人血清白蛋白和重组乳铁蛋白以及这两种蛋白的各种组合对 CHO K1 细胞生产力的影响。表 E10 示出了在基线培养基(无添加剂)中培养 13 天后细胞所产生的抗体产物浓度,产生了 $47.1\mu\text{g/mL}$ 抗体产物。补充了单独重组白蛋白或重组乳铁蛋白或者植物来源重组人血清白蛋白和乳铁蛋白组合的培养基产生了比无添加剂的对照培养基显著更高水平的抗体。第 2 列示出了在基线对照培养基之上的添加剂观察效果。第 3 列示出了两种添加剂组合的预测添加剂效果,其利用预测添加剂等于在相同浓度下单独每种添加剂的总和的模型。

[0529] 讨论:表 E10 证实细胞生长和活力的提高直接转化为提高的抗体表达和细胞生产

力。如细胞的活力和细胞生长的情况,当这些组分一起加入培养物时,观察到蛋白组分的最大效果。

[0530] 表 E11 示出了额外的数据集,其示出了利用与实施例 12 相同的条件,在扩大范围的浓度下添加剂的效果。补充了单独重组白蛋白、或单独乳铁蛋白、或两种蛋白的组的培养基产生了比无添加剂的对照培养基更高水平的抗体。第 2 列示出了在基线对照培养基之上的添加剂观察效果。第 3 列示出了两种添加剂组合的预测效果,其利用预测效果等于在相同浓度下单独加入每种添加剂时的效果的总和的模型。数据显示在所有测试的两种蛋白比例中,组合的实际效果大于预测效果。

[0531]

表 E11					
	产物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	观察效果	预测效果	在预测活性之 上的提高%	乳铁蛋白与 HAS 比例
无添加剂(基线)	56.9	0.0			
单个添加剂					
HSA 0.5g/L	99.1	42.2			
HSA 1 g/L	126.3	69.4			
HSA 2 g/L	186.0	129.1			
HSA 3 g/L	212.9	156.0			
LF					
LF 0.1g/L	123.1	66.2			
LF 0.5g/L	173.5	116.6			
LF 0.8g/L	182.0	125.1			
LF 1.5g/L	196.3	139.4			
组合					
LF 0.1g/L+ HSA 0.5g/L	212.4	155.5	108.5	143%	1:5
LF 0.5g/L+ HSA 0.5g/L	314.9	258.0	158.9	163%	1:1
LF 0.8g/L+ HSA 0.5g/L	302.8	245.9	167.4	147%	1:0.625
LF 1.5g/L+ HSA 0.5g/L	336.8	279.9	181.7	154%	1:0.33
LF 0.1g/L+ HSA 1.0g/L					
LF 0.1g/L+ HSA 1.0g/L	239.7	182.8	135.7	133	1:10

[0532]

LF 0.5g/L+ HSA 1.0g/L	339.4	282.5	186.1	152	1:2
LF 0.8g/L+ HSA 1.0g/L	357.7	300.8	194.6	155	1:1.2
LF 1.5g/L+ HSA 1.0g/L	343.7	286.8	208.9	137	1:0.66
LF 0.1g/L+ HSA 2.0g/L					
LF 0.1g/L+ HSA 2.0g/L	261.3	204.4	195.4	105	1:20
LF 0.5g/L+ HSA 2.0g/L	377.2	320.3	245.8	131	1:4
LF 0.8g/L+ HSA 2.0g/L	414.8	357.9	254.3	141	1:2.4
LF 1.5g/L+ HSA 2.0g/L	358.0	301.1	268.6	112	1:1.33

[0533] 讨论:低至 1 : 0.333 到高达 1 : 20 的乳铁蛋白与白蛋白比例产生了细胞生长的协同刺激。发现乳铁蛋白与白蛋白的最佳比例在 1 : 0.333wt/wt(在 0.5g/L 的白蛋白浓度);在 1 : 1.2wt/wt(在 1.0g/L 的白蛋白浓度);和在 1 : 2.4wt/wt(在 2.0g/L 的白蛋白浓度)。

[0534] 因此细胞生产力的刺激发生在广泛的重组白蛋白和乳铁蛋白比例范围中。乳铁蛋白和重组白蛋白的最佳比例在一定程度上变化,取决于两种蛋白组分的绝对浓度。优选乳铁蛋白与白蛋白比例范围从约 1(乳铁蛋白)比 0.33(白蛋白)至约 1(乳铁蛋白)比 3(白蛋白)wt/wt。

[0535] 实施例 13 :在其他细胞培养组分存在下白蛋白和转铁蛋白组合效果的评价

[0536] 为了确定其他细胞培养组分对乳铁蛋白和白蛋白对细胞生长和活力的协同效应的影响,用先前已被证明对无血清条件中细胞生长必不可少的其他细胞培养组分进行了一系列额外的实验。

[0537] 方法:在无 FBS 的 DMEM/F12 中将在有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中活跃生长的杂交瘤细胞洗涤 3 次以去除 FBS。在以 0.4×10^5 个活细胞/mL 的起始细胞密度接种至 DMEM/F12 的细胞上检测植物来源转铁蛋白、植物来源人重组血清白蛋白、亚硒酸钠和乙醇胺单独以及组合的生长和生产力提高效果。在这些实验中,以 $5.5 \mu\text{g/mL}$ 的起始浓度使用转铁蛋白(TF);以 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $500 \mu\text{g/mL}$ 和 $1000 \mu\text{g/mL}$ 起始浓度使用植物来源重组人血清白蛋白(HSA)和分别以 1 : 500,000v/v 和 $6.7 \mu\text{g/mL}$ 的起始浓度使用亚硒酸钠(SE)和乙醇胺。按照净活细胞浓度计算观察效果(所观察的基础培养基)。按照单个组分效果的总和计算预测效果。

[0538] 向振荡培养物进一步补充各种浓度的上文所列补充物,如下文表 E12 所述。将没有添加补充物的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。3 天后通过 Guava PCA 细胞计数器(Guava Technologies)测定活细胞浓度。使所有培养物在 37°C 、6% CO_2 下在加湿环境中生长。

[0539]

表 E12						
	活细胞/ml	Std	观察效果	预测效果	协同	转铁蛋白与白蛋白比例
DMEM/F12 单独	0.01	0.01				
10% FBS	11.40	0.71	11.39			
TF 5.5 μ g/L	0.02	0.00	0.01			
SE 6.7 μ g/L	0.22	0.13	0.21			
HSA 0.1 g/L	2.31	0.06	2.30			
HSA 0.5 g/L	4.67	0.18	4.66			
HSA 1 g/L	4.55	0.46	4.54			
双						
TF+SE	0.40	0.04	0.38	0.21	是	
TF+ HSA 0.1 g/L	3.00	0.02	2.98	2.30	是	1:18
TF+ HSA 0.5 g/l	5.42	0.20	5.41	4.67	是	1:90
TF+ HSA 1 g/L	5.71	0.14	5.69	4.55	是	1:181
双						
SE+ HSA 0.1 g/l	2.76	0.06	2.75	2.50	是/否	
SE+ HSA 0.5 g/L	4.15	0.16	4.14	4.87	否	
SE+ HSA 1 g/L	3.75	0.22	3.74	4.75	否	
三						
TF+SE+ HSA 0.1 g/L	7.40	0.00	7.39	2.51	是	1:18
TF+SE+ HSA 0.5 g/L	9.48	0.31	9.46	4.87	是	1:90
TF+SE+ HSA 1 g/L	9.71	0.11	9.70	4.75	是	1:181

[0540] 讨论：当一起加入培养基时，重组人血清白蛋白与重组转铁蛋白组合表现出协同效应。在硒存在下该效应进一步增加。然而硒的加入不与单独的重组植物来源人血清白蛋白协同作用。在硒的存在下，并且在约 1（转铁蛋白）比 100（白蛋白）wt/wt 和约 1（转铁蛋白）比 200（白蛋白）的转铁蛋白与植物来源重组人血清白蛋白比例下出现了转铁蛋白和植物来源重组人血清白蛋白的最大协同效应。

[0541] 硒是众所周知的细胞生长和发育的必需痕量元素，并且其在生物系统中的积极作用包括通过激活谷胱甘肽过氧化物酶的自由基解毒作用。此外，在无血清培养基中硒可以作为高效铁载体，这有助于解释其对转铁蛋白刺激的细胞生长的协同影响。（Zhang et al., Biotechnol. Bioeng. (2006) 95 (6) 1188-97）。

[0542] 实施例 14：白蛋白、转铁蛋白和胰岛素组合效果的评价

[0543] 方法：在无 FBS 的 DMEM/F12 中将在有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中活跃生长的杂交瘤细胞洗涤 3 次以去除 FBS。在以 0.4×10^5 个活细胞 /mL 的起始细胞密度接种至 DMEM/F 12 的细胞上检测植物来源转铁蛋白、植物来源人重组血清白蛋白、亚硒酸钠和乙醇胺单独以及胰岛素组合的生长和生产力提高效果。在这些实验中，以 10μ g/mL 的浓度使用重组人胰岛素 (IN) (Millipore)，以 5.5μ g/mL 的起始浓度使用转铁蛋白 (TF)；以 0.1g/L、0.5g/L 和 1g/L 的起始浓度使用植物来源重组人血清白蛋白和分别以 6.7μ g/mL 和

1 : 500,000v/v 的浓度使用亚硒酸钠和乙醇胺。按照净活细胞浓度计算观察效果(所观察的基础培养基)。按照单个组分效果的总和计算预测效果。

[0544] 向振荡培养物进一步补充各种浓度的上文所列因子,如下文表 E13 所述。将没有添加补充物的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。3 天后通过 Guava PCA 细胞计数器(Guava Technologies)测定活细胞浓度。使所有培养物在 37℃、6% CO₂ 下在加湿环境中生长,并且以 2cm 旋转轨道在 120RPM 下振荡。

[0545]

表 E13					
	活细胞/ml	Std	观察效果	预测效果	协同
D/F12 单独	0.01	0.01			
10% FBS	11.65	0.21	11.64		
单独因子					
胰岛素(IN) 10 μg/L	0.04	0.02	0.03		
转铁蛋白(TF) 5.5 μg/L	0.02	0.00	0.01		
亚硒酸钠(SE) 6.7 μg/L	0.22	0.13	0.21		
HSA 0.1 g/L	2.31	0.06	2.30		
HSA 0.5 g/L	4.67	0.18	4.66		
HSA 1 g/L	4.55	0.46	4.54		
双					
IN+TF	0.03	0.02	0.02	0.06	
IN+SE	1.06	0.15	1.05	0.26	是
IN+ HSA 0.1 g/L	2.54	0.08	2.53	2.35	否
IN+ HSA 0.5 g/L	3.96	0.34	3.95	4.71	否

[0546]

IN+HSA 1 g/L	4.61	0.16	4.60	4.59	否
三					
IN+TF+SE	2.13	0.49	2.12	0.28	是
IN+TF+HSA 0.1 g/L	3.29	0.03	3.28	2.37	是
IN+TF+HSA 0.5 g/L	5.84	0.49	5.83	4.73	是
IN+TF+HSA 1 g/L	6.84	0.34	6.83	4.61	是
三					
IN+SE+HSA 0.1 g/L	2.21	0.17	2.19	2.37	否
IN+SE+HSA 0.5 g/L	3.41	0.21	3.39	4.73	否
IN+SE+HSA 1 g/L	3.62	0.23	3.60	4.61	否
四					
IN+TF+SE+HSA 0.1 g/L	7.91	0.46	7.90	2.59	是
IN+TF+SE+HSA 0.5 g/L	9.14	0.63	9.13	4.95	是
IN+TF+SE+HSA 1 g/L	10.07	0.67	10.05	4.83	是

[0547] 讨论：在这些研究中，加入胰岛素和植物来源重组人血清白蛋白不对细胞生长产生协同效应。相比之下，加入植物来源重组人血清白蛋白和转铁蛋白和胰岛素的确对细胞生长产生了协同效应。

[0548] 实施例 15：在硒存在下白蛋白、转铁蛋白和胰岛素组合效果的评价

[0549] 方法：在无 FBS 的 DMEM/F12 中将在有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中活跃生长的杂交瘤细胞洗涤 3 次以去除 FBS。在 0.4×10^5 个活细胞/mL 的含有 $6.7 \mu\text{g/mL}$ 亚硒酸钠的基础培养基中检测植物来源转铁蛋白 (TF)、植物来源重组人血清白蛋白 (HSA)、胰岛素、亚硒酸钠和乙醇胺单独和组合的生长和生产力提高效果。在这些实验中，以 $10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度使用重组人胰岛素 (IN) (Millipore)，以 $5.5 \mu\text{g/L}$ 的起始浓度使用转铁蛋白 (TF)；以 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $500 \mu\text{g/mL}$ 和 $1000 \mu\text{g/mL}$ 的起始浓度使用植物来源重组人血清白蛋白，以 1 : 500,000v/v 的浓度使用乙醇胺。按照净活细胞浓度计算观察效果（所观察的基础培养基）。按照单个组分效果的总和计算预测效果。

[0550] 向振荡培养物进一步补充各种浓度的上文所列因子，如下文表 E14 所述。将没有添加补充物的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。3 天后通过 Guava PCA 细胞计数器 (Guava Technologies) 测定活细胞浓度。使所有培养物在 37°C 、6% CO_2 下在加湿环境中生长。

[0551]

表 E14

条件	活细胞计数 10e5	Std	观察效果	预测效果	在预测活性之上的提高%	协同
D/F12+硒的基础培养基	0.08	0.04	0.00			
10% FBS	13.20	0.28	13.12			
胰岛素	0.30	0.09	0.22			
单独因子						
TF	0.27	0.04	0.19			
HSA 0.1 g/L	2.23	0.11	2.15			
HSA 0.5 g/L	6.21	0.20	6.13			
HSA 1 g/L	8.00	0.05	7.91			
双						
IN+TF	0.48	0.02	0.40	0.41		否
IN+ HSA 0.1 g/L	1.81	0.02	1.72	2.37		否
IN+ HSA 0.5 g/L	6.00	0.09	5.91	6.35		否
IN+ HSA 1 g/L	7.43	0.19	7.35	8.13		否
双						
TF+ HSA 0.1 g/L	4.29	0.04	4.20	2.34	179	是
TF+ HSA 0.5 g/L	12.35	0.21	12.27	6.32	194	是
TF+ HSA 1 g/L	15.48	0.71	15.39	8.1	190	是
三						
IN+TF+ HSA 0.1 g/L	4.18	0.21	4.09	2.56	159	是
IN+TF+ HSA 0.5 g/L	13.60	0.00	13.52	6.54	206	是
IN+TF+ HSA 1 g/L	15.38	0.22	15.29	8.32	184	是

[0552] 讨论：再一次地，如最后的实验所示，当这两种组分一起加入细胞培养基时，植物来源重组人血清白蛋白和胰岛素不产生细胞生长的协同刺激。相比之下，在所有测试的浓度范围中，在植物来源重组人血清白蛋白和转铁蛋白的混合物之间观察到协同作用。在胰岛素存在下对植物来源重组人血清白蛋白和转铁蛋白也观察到协同作用。

[0553] 实施例 16：在乙醇胺存在下白蛋白和转铁蛋白组合效果的评价

[0554] 方法：在无 FBS 的 DMEM/F12 中将在有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中活跃生长的杂交瘤细胞洗涤 3 次以去除 FBS。在 0.4×10^5 个活细胞 /ml 的含有 1 : 500,000 乙醇胺 v/v 的基础培养基中检测植物来源转铁蛋白 (TF)、植物来源重组人血清白蛋白 (HSA)、胰岛素、亚硒酸钠和乙醇胺单独和组合的生长和生产力提高效果。在这些实验中，以 $10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度使用重组人胰岛素 (IN) (Millipore)，以 $5.5 \mu\text{g/mL}$ 的起始浓度使用转铁蛋白 (TF)；以 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $500 \mu\text{g/mL}$ 和 $1000 \mu\text{g/mL}$ 的起始浓度使用植物来源重组人血清白蛋白和以 $6.7 \mu\text{g/mL}$ 的浓度使用亚硒酸钠。按照净活细胞浓度计算观察效果（所观察的基础培养基）。按照单个组分效果的总和计算预测效果。

[0555] 向振荡培养物进一步补充各种浓度的上文所列因子，如下文表 E15 所述。将没有添加补充物的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。3 天后通过 Guava PCA 细胞

计数器 (Guava Technologies) 测定活细胞浓度。使所有培养物在 37℃、6% CO₂ 下在加湿环境中生长。

[0556]

表 E15				
条件	观察效果 (活细胞/ml)	Std	预测效果 (活细胞/ml)	协同
D/F12+乙醇胺的基础培养基	0.51	0.16		
10% FBS	14.45	0.64		
IN	1.41	0.24		
单独因子				
TF	2.08	0.15		
HSA 0.1 g/L	2.16	0.07		
HSA 0.5 g/L	5.66	0.35		
HSA 1 g/L	7.08	0.21		
双				
IN+TF	3.12	0.11	3.48	否
IN+ HSA 0.1 g/L	1.87	0.00	3.57	否
IN+ HSA 0.5 g/L	4.48	0.25	7.07	否
IN+ HSA 1 g/L	5.14	0.19	8.49	否
双				
TF+ HSA 0.1 g/L	6.72	0.35	4.24	是
TF+ HSA 0.5 g/L	12.30	0.26	7.74	是
TF+ HSA 1 g/L	16.20	0.65	9.16	是
三				
IN+TF+ HSA 0.1 g/L	7.46	0.28	5.64	是
IN+TF+ HSA 0.5 g/L	13.30	0.36	9.15	是
IN+TF+ HSA 1 g/L	16.60	0.48	10.57	是

[0557] 讨论：再一次地，如最后的实验所示，当这两种组分一起加入细胞培养基时，植物来源重组人血清白蛋白和胰岛素的组合不产生细胞生长的协同刺激。相比之下，在所有测试的浓度范围中，在植物来源重组人血清白蛋白和转铁蛋白的混合物之间观察到协同作用。在这些条件下，在胰岛素存在下对植物来源重组人血清白蛋白和转铁蛋白也观察到协同作用。

[0558] 出人意料地，胰岛素、转铁蛋白和植物来源重组人血清白蛋白的组合与产生了比 10% 血清更好的细胞生长，证实了蛋白的这些组合的优越特性。

[0559] 实施例 17：水稻重组产生的白蛋白和血浆来源的白蛋白的比较

[0560] 为了直接与血浆来源血清白蛋白 (pHSA) 比较水稻来源重组人血清白蛋白 (rHSA) 的效果，当与水稻来源重组转铁蛋白混合时，在 2 个比例下直接比较两种样品刺激细胞生

长的能力。

[0561] 方法:使杂交瘤细胞在 10% FBS 的 DMEM/F12 (Gibco) 中生长。将对数生长期的细胞收获,在 DMEM/F12 中洗涤 3 次以去除 FBS,并且以 0.75×10^5 个活细胞/ml 接种在 1)DMEM/F12 基础培养基,2)DMEM/F12+ 硒酸钠基础培养基或 3)DMEM/F12 基础培养基中。向每种基础培养基进一步补充重组转铁蛋白 (TF)、水稻来源重组人血清白蛋白 (rHSA)、血浆来源人血清白蛋白 (pHSA) 或者转铁蛋白和任一形式白蛋白的组合。在 37℃、5% CO₂ 下培养 3 天之后,如制造商指示通过 Guava PCA 细胞计数器测定活细胞浓度。按照净活细胞浓度计算观察效果 (所观察的基础培养基)。按照单个组分效果的总和计算预测效果。按照观察效果除以预测效果计算效应系数。效应系数 1 表示预测效果 (添加剂)。效应系数 > 1 表示多于添加剂或协同效应。

[0562] 在这些实验中,以 1 和 3mg/L 的起始浓度使用转铁蛋白 (TF);以 5g/L 的浓度使用白蛋白,以 6.7 μg/L 的浓度使用亚硒酸钠和以 1 : 500,000v/v 使用乙醇胺。

[0563]

表 E16					
基础培养基: DMEM/F12	活细胞/ml 10e5	Std	观察效果	预测效应	效应系数 (实际/预期)
基础培养基	0.11	0.07			
单独组分					

[0564]

rTF 1 mg/L	0.21	0.01	0.10		
rTF 3 mg/L	0.28	0.09	0.18		
pHSA 5 g/L (Seracare)	11.30	0.28	11.19		
rHSA 5 g/L (Cellastim)	5.11	0.02	5.00		
<u>pHSA 组合</u>					
rTF 1 mg/L + pHSA 5 g/L	12.85	0.49	12.74	11.51	1.1
rTF3 mg/L + pHSA 5 g/L	13.20	0.42	13.09	16.41	0.8
<u>rHSA 组合</u>					
rTF1 mg/L + rHSA 5 g/L	18.80	0.71	18.69	5.31	3.5
rTF3 mg/L + rHSA 5 g/L	18.85	0.92	18.74	5.39	3.5
基础培养基: DMEM/F12	活细胞/ml 10e5	Std	观察效果	预测效果	效应系数 (实际/预期)
基础培养基	0.04	0.02			
<u>单独组分</u>					
rTF 1 mg/L	0.14	0.01	0.10		
rTF 3 mg/L	0.14	0.05	0.10		
pHSA 5 g/L	6.08	0.13	6.04		
rHSA 5 g/L	1.76	0.17	1.72		
<u>pHSA 组合</u>					
rTF 1 mg/L + pHSA 5 g/L	7.46	0.49	7.42	6.22	1.2
rTF3 mg/L + pHSA 5 g/L	7.84	0.05	7.79	7.84	1.0
<u>rHSA 组合</u>					
rTF1 mg/L + rHSA 5 g/L	8.55	0.79	8.51	1.90	4.5
rTF3 mg/L + rHSA 5 g/L	8.37	0.23	8.33	1.90	4.4
基础培养基: DMEM/F12	活细胞/ml 10e5	Std	观察效果	预测效果	效应系数 (实际/预期)
基础培养基	1.01	0.02			
<u>单独组分</u>					
rTF 1 mg/L	3.45	0.27	2.44		
rTF 3 mg/L	3.47	0.27	2.46		
pHSA 5 g/L	13.15	0.49	12.14		
rHSA 5 g/L	3.46	0.13	2.45		
<u>pHSA 组合</u>					
rTF 1 mg/L + pHSA 5 g/L	14.83	0.49	13.82	16.60	0.8

[0565]

rTF3 mg/L + pHSA 5 g/L	14.57	0.12	13.56	16.61	0.8
rHSA 组合					
rTF1 mg/L + rHSA 5 g/L	17.87	1.46	16.86	6.91	2.4
rTF3 mg/L + rHSA 5 g/L	20.20	1.13	19.19	6.93	2.8

[0566] 讨论：表 E14 示出了 3 个独立实验的结果，证实 TF 与水稻来源重组人血清白蛋白的组合产生了远大于预测效果的观察效果值。相比之下，血浆来源 HSA 和转铁蛋白的组合产生了相似于或少于预期效果的值。因此白蛋白协同提高转铁蛋白和乳铁蛋白活性的能力看来取决于白蛋白的来源，而不是白蛋白自身的固有特性。确切地说，目前的实验证实人血清白蛋白与诸如转铁蛋白和乳铁蛋白的转铁蛋白相关蛋白的协同特性是意外和惊人的水稻来源重组人血清白蛋白特性。显著地，在刺激细胞生长中转铁蛋白和植物来源重组白蛋白的组合比血浆来源白蛋白和转铁蛋白的组合更有效，尽管在 5g/L 单独血浆来源白蛋白比相同浓度的水稻来源人血清白蛋白更有效。

[0567] 实施例 18：与血浆来源或重组转铁蛋白组合的水稻来源重组白蛋白刺激细胞生长能力的评价

[0568] 为了直接与血浆来源转铁蛋白 (pTF) 比较水稻来源重组人转铁蛋白 (rTF) 的效果，当与水稻来源重组人血清白蛋白混合时，直接比较两种样品刺激细胞生长的能力。

[0569] 方法：组成基础培养基 (BM)，其由 DMEM/F12+ 亚硒酸钠 0.0067mg/L、乙醇胺 1 : 500,000v/v 组成。基础培养基包括与血浆 HSA (pHSA, 细胞培养级 Seracare) 或水稻来源重组 HSA (rHSA) 组合的浓度为 5.5mg/L 的人血浆转铁蛋白、pTF。将对数生长期的杂交瘤细胞收获，在 DMEM/F12 中洗涤 3 次以去除 FBS，然后以 0.80×10^5 个活细胞 /ml 接种并在 37℃、6% CO₂ 下培养。如制造商指示通过 Guava PCA 细胞计数器每天测定活细胞浓度。在第 6 天通过定量 ELISA 测定细胞产生并分泌入培养基的抗体浓度 (Bethyl laboratories)。误差棒示出了标准差。pTF+rHSA 组合的抗体产量与 DMEM/F12+10% FBS 的相似。

[0570] 讨论：图 13 显示水稻来源重组人血清白蛋白能够与血浆来源转铁蛋白协同作用以显著提高细胞的生长和生产力。相比之下，血浆来源血清白蛋白不能发挥相似的刺激效果。确切地说，目前的实验证实水稻来源人血清白蛋白的协同特性对血浆来源或重组的转铁蛋白相关蛋白也有效。

[0571] 实施例 19：与胰岛素相关生长因子 -1 组合的水稻来源重组白蛋白刺激细胞生长能力的评价

[0572] 为了研究植物来源人血清白蛋白 (Cellastim) 的特有属性是否可以正面影响诸如生长因子 IGF-1 的其他细胞培养组分的生长促进活性，进行了额外的实验以评价这个可能性。

[0573] 方法：如先前所述将 CHO K1 系 DP12 克隆 1934(ATCC#CRL-12445) 维持在补充了 0.5% FBS、1 μM 氨甲喋呤、50 μg/mL 青霉素 / 链霉素、1mM Glutamax(Invitrogen) 的 SAFC 325PF 无蛋白 CHO 培养基中。检测了植物来源重组人血清白蛋白 (rHSA) (实施例 3 和 5) 和重组胰岛素相关生长因子 1(IGF1) (Ajinomoto) 单独或组合的生长和生产力提高效果。在含有 200nM 氨甲喋呤、50 μg/mL 青霉素 / 链霉素的 325PF CHO 培养基中将细胞洗涤 2 次，并

且以 1.5×10^5 个细胞/ml 接种在相同培养基中至 4ml 振荡分批培养物。向 4ml 振荡培养物进一步补充各种浓度的 rHSA 或 IGF-1 或这两种添加剂的各种混合物。将没有添加 rHSA 或 IGF-1 的对照培养物用作基线。所有培养条件重复进行。在 14 天批周期通过 Guava PCA 细胞计数器 (Guava Technologies) 每天测定活细胞浓度。培养 6 天后通过细胞的相对增殖判断对数生长期。使所有培养物在 37°C 、6% CO_2 下在加湿环境中生长。表 E17 示出了该实验的结果。这里,按照净活细胞浓度计算观察效果(所观察的基础培养基),并且按照单个组分效果的总和计算预测效果。

[0574]

表 E17			
	活细胞/ml 10e5	观察效果 (细胞计数-基线)	预测效果
无添加剂(基线)	3.3	0.0	
HSA 0.5 g/L	7.3	4.0	
HSA 1g/L	7.9	4.6	
IGF-1 30 nM	12.0	8.7	
HSA 0.5 g/L+ IGF-1 30nM	23.5	15.6	12.7
HSA 1 g/L+ IGF-1 30nM	25.6	13.6	13.3

[0575] 结果和讨论:表 E17 显示水稻来源重组人血清白蛋白能够与重组 IGF-1 协同作用以显著提高细胞的生长和生产力。相比之下,重组白蛋白不与胰岛素协同作用(表 E15),表明协同作用不是遍及所有细胞培养组分的一般效应。确切地说,目前的实验证实水稻来源人血清白蛋白的协同特性与 IGF-1 组合也有效。

[0576] 当然,应该理解上文的描述仅以实例的方式给出,在本发明的范围之内可以进行细节的修改。

[0577] 本领域技术人员根据本公开应当理解,能够对本发明进行形式和功能上相当的修饰、改变和等同替代。

[0578] 尽管在此以目前考虑的优选实施方案描述了本发明,但本发明并不限于此。相反,本发明意图覆盖包括在上文所提供的详细描述的精神和范围之内的各种修改和等同安排。

[0001]

序列表

Organization Applicant

Street : 4110 N. Freeway Blvd.
City : Sacramento
State : CA
Country : US
PostalCode : 95834
PhoneNumber : 916-921-6148
FaxNumber : 916-921-5611
EmailAddress :

<110> OrganizationName : 文特里亚生物科学公司

Application Project

<120> Title : 含有蛋白质组合的细胞培养基
<130> AppFileReference : VBS0002-401-PC
<140> CurrentAppNumber :
<141> CurrentFilingDate : ____-__-__

Earlier Applications

<150> PriorAppNumber : 61/154, 204
<151> PriorFilingDate : 2009-02-20

Sequence

<213> OrganismName : Homo sapiens
<400> PreSequenceString :
MKWVTFISLL FLFSAYSRG VRRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVIA FAQYLQCCPF 60EDHVKLVNEV
TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP 120ERNECFLQHK DDNPNLRLV
RPEVDVMCTA PHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF 180FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDEL
DEGKASSAQ RLKASLQKF GERAFAWAV 240ARLSQRFPA EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDLLCADD
RADLAKYICE NQDSISSKLK 300ECCEKPLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF
LGMFLYEYAR 360RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIQNCSELF
420QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSV 480LNQLCVLHEK
TPVSDRVTKC CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHADICTL 540SEKERQIKKQ TALVELVKHK
PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCCKADKET CFAEGKKLV 600AASQAALGL
609

<212> Type : PRT

<211> Length : 609

SequenceName : SEQ ID 1:

SequenceDescription :

Sequence

[0002]

<213> OrganismName : Synthetic

<400> PreSequenceString :

ATAGDTHLGG EDFDNRVVP G PADKSPMIVV TYKGEEKNV ITVPAYFNDS QRIINEPTAA 60AIAYGLDKK
69

<212> Type : PRT

<211> Length : 69

SequenceName : SEQ ID 2:

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Synthetic

<400> PreSequenceString :

NQAAVNPERN GHVEIIANDQ GNRIVNKDGK PYIQVKIINE PTAAAIAYGL DKKKLGTVIG 60IDLGTTYSCV
GVYKVEIESL FDGTDSFSEP LTR 93

<212> Type : PRT

<211> Length : 93

SequenceName : SEQ ID 3:

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Synthetic

<400> PreSequenceString :

NQADSVVYQT EKKQDITITG ASTLPKDEVE RDVVLLDVTP LSLSLGLETL GGVMTK 56

<212> Type : PRT

<211> Length : 56

SequenceName : SEQ ID 4:

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Oryza Sativa

<400> PreSequenceString :

MAGNKGEIPA IGIDLGTTYS CVGVWQHDRV EIIANDQG NR TTPSYVAFTD TERLIGDAAK 60NQVAMNPTNT
VFDAKRLIGR RFS DPSVQAD MKMWPFKVVP GPADKPMIVV TYKGEEKKFS 120AEEISSMVL T KMKEIAEAF L
STTIKNAVIT VPAYFNDSQR QATKDAGVIS GLNVMRIINE 180PTAAAIAYGL DKKAAS TGEK NVLIFDLGGG
TFDVSILTIE EGIFEVKATA GDTHLGGEDF 240DNRMVNHVQ EFKRKHKKDI TGNPRALRRL RTACERAKRT
LSSTAQT TIE IESLYEGIDF 300YATITRARFE ELNMDLFRRC MEPVEKCLRD AKMDKAQIHD VVLVGGSTRI
PKVQQLQDF 360FNGKELCKSI NPDEAVAYGA AVQAAILSGE GNQRVQDLLL LDVTPLSLGL ETAGGVMTVL
420IPRNTTIPTK KEQVFSTYS D NQPGVLIQVY EGERTRTKDN NLLGKFELTG IPPAPRGVPQ 480INVTFDIDAN
GILNVSAEDK TTGKKNKITI TNDKGRLSKE EIERMVQEAE KYKAED EQVR 540HKVEARNALE NYAYNMRNTV
RDEKIASKLP ADDKKKIEDA IEDA IKWLDG NQLAEAD EFE 600DKMKELESLC NPIISKMYQG GAGGPAGMDE
DAPNGSAGTG GSGAGPKIE EVD 653

<212> Type : PRT

[0003]

<211> Length : 653

SequenceName : SEQ ID 5:

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Oryza Sativa

<400> PreSequenceString :

```
MDRVRGSAFL LGVLLAGSLF AFSVAKEETK KLGTVIGIDL GTTYSCVGVY KNGHVEIIAN      60DQGNRITPSW
VAFTDSERLI GEAANKQAAV NPRTIFDVK RDIGRKFEED EVQRDMKLV      120YKIVNKIGKP YIQVKIKDGE
NKVFSPEEVS AMILGKMKET AEAYLGKKIN DAVVTVPAYF      180NDAQRQATKD AGVIAGLNVA RIINEPTAAA
IAYGLDKKGG EKNILVFDLG GGTFDVSILT      240IDNGVFEVLA TNGDTHLGGE DFDQRIMEYF IKLIKKKYSK
DISKDNRALG KLRREAERAK      300RALSNDHQVR VEIESLFDGT DFSEPLTRAR FEELNNDLFR KTMGPVKKAM
DDAGLEKSQI      360HEIVLVGGST RIPKVQQLR DYFEGKEPNK GVNPD EAVAY GAAVQGSILS GEGGDETKDI
420LLLDVAPLTL GIETVGGVMT KLIPRNTVIP TKKSQVFTTY QDQQTTSIQ VFEGERSMTK      480DCRLLGKFDL
SGIPAAPRGT PQIEVTFEVD ANGILNVKAE DKGTGKSEKI TITNEKGRLS      540QEEIDRMVRE AEEFAEEDKK
VKERIDARNQ LETYVNMKN TVGDKDKLAD KLESEEKEKV      600EEALKEALEW LDENQTAEKE EYEEKLKEVE
AVCNPIISAV      YQRTGGAPGG      RRRGRLDDEH      660DEL
```

663

<212> Type : PRT

<211> Length : 663

SequenceName : SEQ ID 6:

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Oryza Sativa

<400> PreSequenceString :

```
MASFTSQLGA MACGAAPSTS PLAARRSGQL FVGRKPAAAS VQMRVPRAGR ARGVAMRVAC      60EKVVIGIDLT
TNSAVAAMEG GKPTVITNAE GQRTTPSVVA YTKGGERLVG QIAKRQAVVN      120PENTFFSVKR FIGRKMAEVD
DEAKQVSYHV VRDDNGNVKL DCPAIGKQFA AEEISAQVLR      180KLVD DASKFL NDKITKAVVT VPAYFNDQR
TATKDAGRIA GLEVLRIINE PTAASLAYGF      240EKKNNETILV FDLGGGTFDV SVLEVGDGVF EVLSTSGDTH
LGGDDFDKFY FCWVFYFGAM      300THETPKVVDW LASNFKKDEG IDLLKDKQAL QRLTEAAEKA KMELSTLSQT
NISLPFITAT      360ADGPKHIETT LSRKFEELC SDLIDRLKTP VTNALRDAKL SVDNLDEVIL VGGSTRIPSV
420QELVKKITGK DPNVTVPNDE VVSLGAAVQG GVLADGVKDV VLLDVTPLSL GLETLGGVMT      480KIIPRNTTLP
TSKSEVFSTA ADGQTSVEIN VLQGEREFVR DNKSLGSFRL DGIPPAPRGV      540PQIEVKFDID ANGILSVAAI
DKGTGKKQDI TITGASTLPK DEVERMVVEA DKFAQEDKEK      600DAIDTKNQA DSVVYQTEKQ LKELGDKVPA
PVKEKVDKAL NELKEAIAGG STQSMKDAMA      660ALNEEVMQIG QAMYNQPNNA GAAGPTPGAD AGPTSSGGKG
PNDGDVIDAD FTDSN      715
```

<212> Type : PRT

<211> Length : 715

SequenceName : SEQ ID 7:

SequenceDescription :

图 1A

图 1B

native lac	1280 CCT AAN P N	1290 TGT GTG V D	1300 AGA CCT R P	1310 GAT GAA D G	1320 GGA GGA G A	1330 TAT CTT Y L	1340 GCT GTG A V	1350 GCG GTG G V	1360 GTG GTT V T	1370 AGG AGA R R	1380 TCA TCA S A	1390 GAC ACT C T	1400 AGC AGC S L	1410 CTT ACT T T	1420 TCT ACC T C
cod opt lac	1280 CCC AAC C C	1290 TGC GTG C G	1300 CGC CCC C C	1310 GTC GAG C G	1320 GGC GGC C C	1330 TAC CTC C C	1340 GCC GTG C C	1350 GTC GTG C C	1360 CGC CGG C C	1370 TCC TCC C C	1380 GAC ACC C C	1390 TCC TCC C C	1400 CTG ACC C C	1410 ACG ACC C C	1420 TCC TCC C C
native lac	1280 CCT AAC C C	1290 TGT GTG V D	1300 AGA CCT R P	1310 GAT GAA D G	1320 GGA GGA G A	1330 TAT CTT Y L	1340 GCT GTG A V	1350 GCG GTG G V	1360 GTG GTT V T	1370 AGG AGA R R	1380 TCA TCA S A	1390 GAC ACT C T	1400 AGC AGC S L	1410 CTT ACT T T	1420 TCT ACC T C
native lac	1360 TGG AAC W N	1370 TCT GTG S V	1380 AAA AAA K K	1390 GGC AAG G K	1400 AAG TCC K S	1410 TCC TGC C H	1420 CAC ACC C T	1430 GCC GTG A V	1440 GAC AGG C D	1450 ACT ACT T R	1460 GCA GGC A G	1470 TGG AAT G W	1480 ATC ATC I I	1490 CCC ATG P M	1500 GGC GGC G G
cod opt lac	1360 TGG AAC T T	1370 AGC GTC C C	1380 AAG AAG K K	1390 GGC AAG G K	1400 AAG TCC K S	1410 TCC TGC C H	1420 CAC ACC C T	1430 GCC GTG A V	1440 GAC AGG C D	1450 ACT ACT T R	1460 GCA GGC A G	1470 TGG AAT G W	1480 ATC ATC I I	1490 CCC ATG P M	1500 GGC GGC G G
native lac	1360 TGG AAC T T	1370 AGC GTC C C	1380 AAG AAG K K	1390 GGC AAG G K	1400 AAG TCC K S	1410 TCC TGC C H	1420 CAC ACC C T	1430 GCC GTG A V	1440 GAC AGG C D	1450 ACT ACT T R	1460 GCA GGC A G	1470 TGG AAT G W	1480 ATC ATC I I	1490 CCC ATG P M	1500 GGC GGC G G
native lac	1430 CTG CTC L L	1440 TTC AAC F N	1450 CAG CAG Q T	1460 ACG GGC G G	1470 TCC TGC C C	1480 AAA TTT K F	1490 GAT GAT D E	1500 GAA TAT S Y	1510 TTC TTC T T	1520 AGT AGT S S	1530 CAA AGC A S	1540 TGT TGT C C	1550 GCC CCT A F	1560 GGG GGT G S	1570 TCT GAC D D
cod opt lac	1430 CTC CTC T T	1440 AAC AAC C C	1450 CAG CAG Q T	1460 ACG GGC G G	1470 TCC TGC C C	1480 AAA TTT K F	1490 GAT GAT D E	1500 GAA TAT S Y	1510 TTC TTC T T	1520 AGT AGT S S	1530 CAA AGC A S	1540 TGT TGT C C	1550 GCC CCT A F	1560 GGG GGT G S	1570 TCT GAC D D
native lac	1430 CTG CTC L L	1440 TTC AAC F N	1450 CAG CAG Q T	1460 ACG GGC G G	1470 TCC TGC C C	1480 AAA TTT K F	1490 GAT GAT D E	1500 GAA TAT S Y	1510 TTC TTC T T	1520 AGT AGT S S	1530 CAA AGC A S	1540 TGT TGT C C	1550 GCC CCT A F	1560 GGG GGT G S	1570 TCT GAC D D
native lac	1510 AGA TCT R S	1520 AAT CTC N L	1530 TGT OCT T C	1540 CTG CTG A L	1550 TGT ATT C I	1560 GOC GOC G D	1570 CAG CAG Q E	1580 GGT GGT G G	1590 AAT AAT N N	1600 AAG AAG K K	1610 TGC TGC C C	1620 GTG GTG C C	1630 CCC CCC C C	1640 GGC GGC C C	1650 TGG GAC C C
cod opt lac	1510 AGC AAC C C	1520 CTG CTC G G	1530 GOC GOC C C	1540 TGC TGC C C	1550 TGT ATT C I	1560 GOC GOC G D	1570 CAG CAG Q E	1580 GGT GGT G G	1590 AAT AAT N N	1600 AAG AAG K K	1610 TGC TGC C C	1620 GTG GTG C C	1630 CCC CCC C C	1640 GGC GGC C C	1650 TGG GAC C C
native lac	1510 AGA TCT R S	1520 AAT CTC N L	1530 TGT OCT T C	1540 CTG CTG A L	1550 TGT ATT C I	1560 GOC GOC G D	1570 CAG CAG Q E	1580 GGT GGT G G	1590 AAT AAT N N	1600 AAG AAG K K	1610 TGC TGC C C	1620 GTG GTG C C	1630 CCC CCC C C	1640 GGC GGC C C	1650 TGG GAC C C
native lac	1580 TAC TAC Y Y	1590 GGC TAC G Y	1600 ACT ACT T G	1610 GGG GCT G A	1620 TTC CGG F R	1630 TGC TGC C C	1640 CTG GCT L A	1650 GAG AAT E N	1660 GCT GCT A G	1670 GGA GAC D V	1680 GTT GCA T V	1690 TTC TTA F A	1700 GTA AAA K A	1710 GAT GTC D V	1720 ACT ACT T C
cod opt lac	1580 TAC TAC T T	1590 GGC TAC C C	1600 ACT ACT T G												

图 1C

413 = 改变的密码子的数量

89

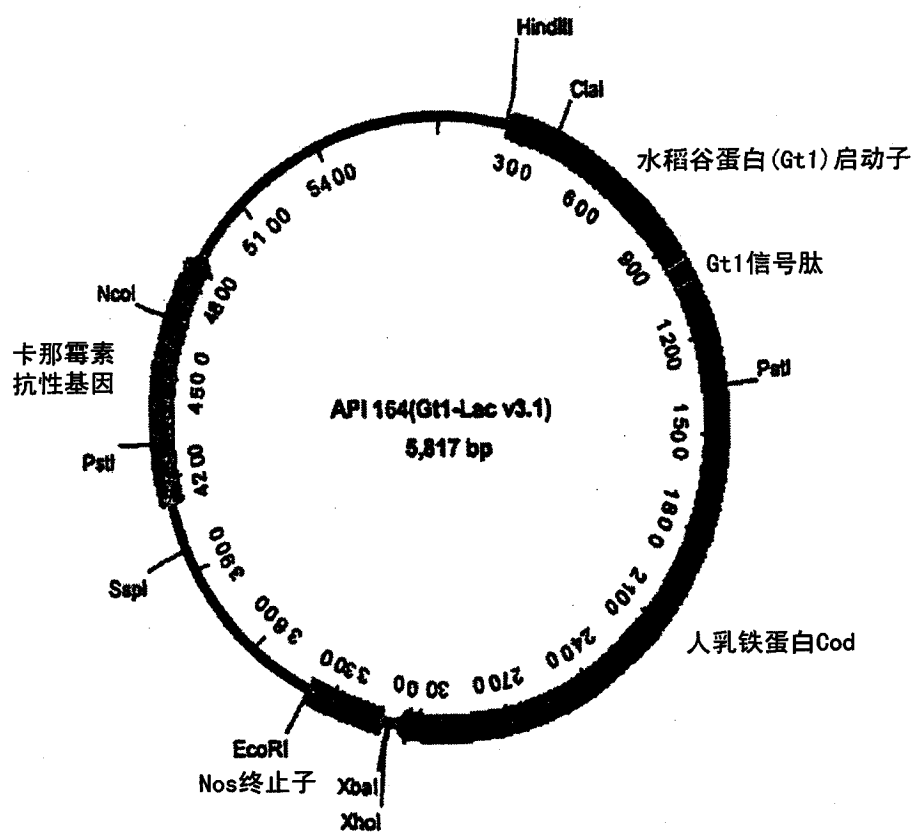


图 2

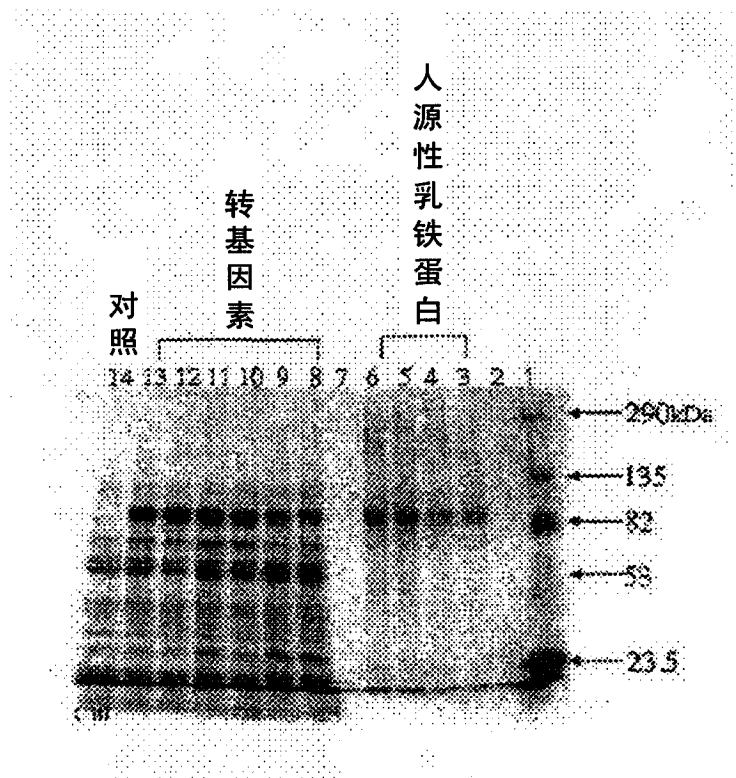


图 3

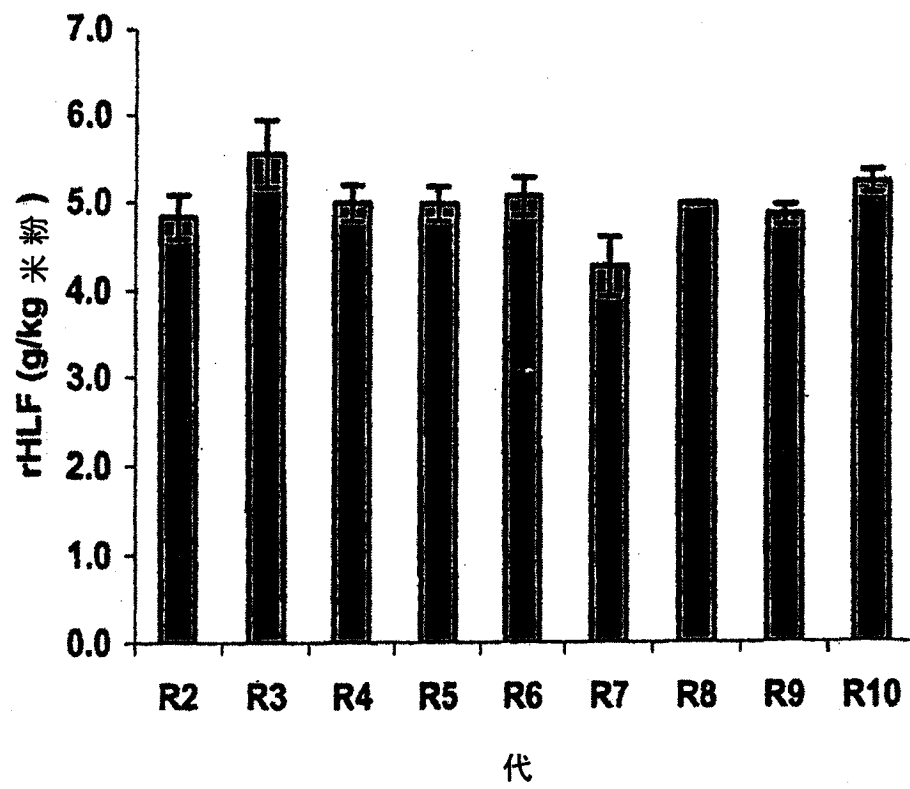


图 4

```

      10      20      30      40
ATG GCA TCC ATA AAT CGC CCC ATA GTT TTC TTC ACA GTT TGC TTG
M  A  S  I  N  R  P  I  V  F  F  T  V  C  L>
_a_a_a_a_a_a_a_GT1 SP_a_a_a_a_a_a_a_>

      50      60      70      80      90
TTC CTC TTG TGC GAT GGC TCC CTA GCC GAC GCC CAC AAG AGC GAG
F  L  L  C  D  G  S  L  A>
_a_a_a_a_GT1 SP_a_a_a_a_>
      D  A  H  K  S  E>
      _OPTIMIZED HSA _b_>

     100     110     120     130
GTG GCC CAC CGC TTC AAG GAC CTC GGC GAG GAG AAC TTC AAG GCC
V  A  H  R  F  K  D  L  G  E  E  N  F  K  A>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     140     150     160     170     180
CTC GTG CTC ATC GCC TTC GCC CAG TAC CTC CAG CAG TGC CCG TTC
L  V  L  I  A  F  A  Q  Y  L  Q  Q  C  P  F>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     190     200     210     220
GAG GAC CAC GTG AAG CTC GTG AAC GAG GTG ACC GAG TTC GCC AAG
E  D  H  V  K  L  V  N  E  V  T  E  F  A  K>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     230     240     250     260     270
ACC TGC GTG GCC GAC GAG AGC GCC GAG AAC TGC GAC AAG AGC CTC
T  C  V  A  D  E  S  A  E  N  C  D  K  S  L>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     280     290     300     310
CAC ACC CTC TTC GGC GAC AAG CTC TGC ACC GTG GCC ACC CTC CGC
H  T  L  F  G  D  K  L  C  T  V  A  T  L  R>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     320     330     340     350     360
GAG ACC TAC GGC GAG ATG GCC GAC TGC TGC GCC AAG CAG GAG CCG
E  T  Y  G  E  M  A  D  C  C  A  K  Q  E  P>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     370     380     390     400
GAG CGC AAC GAG TGC TTC CTC CAG CAC AAG GAC GAC AAC CCG AAC
E  R  N  E  C  F  L  Q  H  K  D  D  N  P  N>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

     410     420     430     440     450
CTC CCG CGC CTC GTG CGC CCG GAG GTG GAC GTG ATG TGC ACC GCC
L  P  R  L  V  R  P  E  V  D  V  M  C  T  A>
_b_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_b_>

```

图 5A

```

      460      470      480      490
TTC CAC GAC AAC GAG GAG ACC TTC CTC AAG AAG TAC CTC TAC GAG
F H D N E E T F L K K Y L Y E>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      500      510      520      530      540
ATC GCC CGC CGC CAC CCG TAC TTC TAC GCC CCG GAG CTC CTC TTC
I A R R H P Y F Y A P E L L F>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      550      560      570      580
TTC GCC AAG CGC TAC AAG GCC GCC TTC ACC GAG TGC TGC CAG GCC
F A K R Y K A A F T E C C Q A>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      590      600      610      620      630
GCC GAC AAG GCC GCC TGC CTC CTC CCG AAG CTC GAC GAG CTC CGC
A D K A A C L L P K L D E L R>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      640      650      660      670
GAC GAG GGC AAG GCC TCC AGC GCC AAG CAG CGC CTC AAG TGC GCC
D E G K A S S A K Q R L K C A>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      680      690      700      710      720
AGC CTC CAG AAG TTC GGC GAG CGC GCC TTC AAG GCC TGG GCC GTG
S L Q K P G E R A F K A W A V>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      730      740      750      760
GCC CGC CTC AGC CAG CGC TTC CCG AAG GCC GAG TTC GCC GAG GTG
A R L S Q R F P K A E F A E V>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      770      780      790      800      810
TCC AAG CTC GTG ACC GAC CTC ACC AAG GTG CAC ACC GAG TGC TGC
S K L V T D L T K V H T E C C>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      820      830      840      850
CAC GGC GAC CTC CTG GAG TGC GCC GAC GAC CGC GCC GAC CTC GCC
H G D L L E C A D D R A D L A>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      860      870      880      890      900
AAG TAC ATC TGC GAG AAC CAG GAC AGC ATC TCC AGC AAG CTC AAG
K Y I C E N Q D S I S S K L K>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

      910      920      930      940
GAG TGC TGC GAG AAG CCG CTC CTG GAG AAG TCC CAC TGC ATC GCC
E C C E K P L L E K S H C I A>
_b_b_b_b_b_OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b_>

```

图 5B

```

950          960          970          980          990
GAG GTG GAG AAC GAC GAG ATG CCG GCC GAC CTC CCG TCC CTC GCC
E V E N D E M P A D L P S L A>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1000         1010         1020         1030
GCC GAC TTC GTG GAG AGC AAG GAC GTG TGC AAG AAC TAC GCC GAG
A D F V E S K D V C K N Y A E>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1040         1050         1060         1070         1080
GCC AAG GAC GTC TTC CTC GGC ATG TTC CTC TAC GAG TAC GCC CGC
A K D V F L G M F L Y E Y A R>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1090         1100         1110         1120
CGC CAC CCG GAC TAC TCC GTG GTG CTC CTC CTC CGC CTC GCC AAG
R H P D Y S V V L L L R L A K>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1130         1140         1150         1160         1170
ACC TAC GAG ACC ACC CTG GAG AAG TGC TGC GCC GCC GCC GAC CCG
T Y E T T L E K C C A A A D P>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1180         1190         1200         1210
CAC GAG TGC TAC GCC AAG GTG TTC GAC GAG TTC AAG CCG CTC GTG
H E C Y A K V F D E F K P L V>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1220         1230         1240         1250         1260
GAG GAG CCG CAG AAC CTC ATC AAG CAG AAC TGC GAG CTC TTC GAG
E E P Q N L I K Q N C E L F E>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1270         1280         1290         1300
CAG CTC GGC GAG TAC AAG TTC CAG AAC GCC CTC CTC GTG CGC TAC
Q L G E Y K F Q N A L L V R Y>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1310         1320         1330         1340         1350
ACC AAG AAG GTG CCG CAG GTG TCC ACC CCG ACC CTC GTG GAG GTG
T K K V P Q V S T P T L V E V>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1360         1370         1380         1390
TCC CGC AAC CTC GGC AAG GTG GGC AGC AAG TGC TGC AAG CAC CCG
S R N L G K V G S K C C K H P>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

1400         1410         1420         1430         1440
GAG GCC AAG CGC ATG CCG TGC GCC GAG GAC TAC CTC TCC GTG GTG
E A K R M P C A E D Y L S V V>
_b_b_b_b_b OPTIMIZED HSA _b_b_b_b_b>

```

图 5C

```

      1450      1460      1470      1480
CTC AAC CAG CTC TGC GTG CTC CAC GAG AAG ACC CCG GTG AGC GAC
L  N  Q  L  C  V  L  H  E  K  T  P  V  S  D>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1490      1500      1510      1520      1530
CGC GTG ACC AAG TGC TGC ACC GAG AGC CTC GTG AAC CGC CGC CCG
R  V  T  K  C  C  T  E  S  L  V  N  R  R  P>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1540      1550      1560      1570
TGC TTC TCC GCC CTG GAG GTC GAC GAG ACC TAC GTC CCG AAG GAG
C  F  S  A  L  E  V  D  E  T  Y  V  P  K  E>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1580      1590      1600      1610      1620
TTC AAC GCC GAG ACC TTC ACC TTC CAC GCC GAC ATC TGC ACC CTC
F  N  A  E  T  F  T  F  H  A  D  I  C  T  L>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1630      1640      1650      1660
TCC GAG AAG GAG CGC CAG ATC AAG AAG CAG ACC GCC CTC GTC GAG
S  E  K  E  R  Q  I  K  K  Q  T  A  L  V  E>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1670      1680      1690      1700      1710
CTC GTG AAG CAC AAG CCG AAG GCC ACC AAG GAG CAG CTC AAG GCC
L  V  K  H  K  P  K  A  T  K  E  Q  L  K  A>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1720      1730      1740      1750
GTG ATG GAC GAC TTC GCC GCC TTC GTG GAG AAG TGC TGC AAG GCC
V  M  D  D  F  A  A  F  V  E  K  C  C  K  A>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1760      1770      1780      1790      1800
GAC GAC AAG GAG ACC TGC TTC GCC GAG GAG GGC AAG AAG CTC GTG
D  D  K  E  T  C  F  A  E  E  G  K  K  L  V>
__b__b__b__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__b__b__b__>

      1810      1820      1830
GCC GCC AGC CAG GCC GCC CTC GGC CTC TGA
A  A  S  Q  A  A  L  G  L  *>
__b__b__b__OPTIMIZED HSA __b__b__b__>

```

图 5D

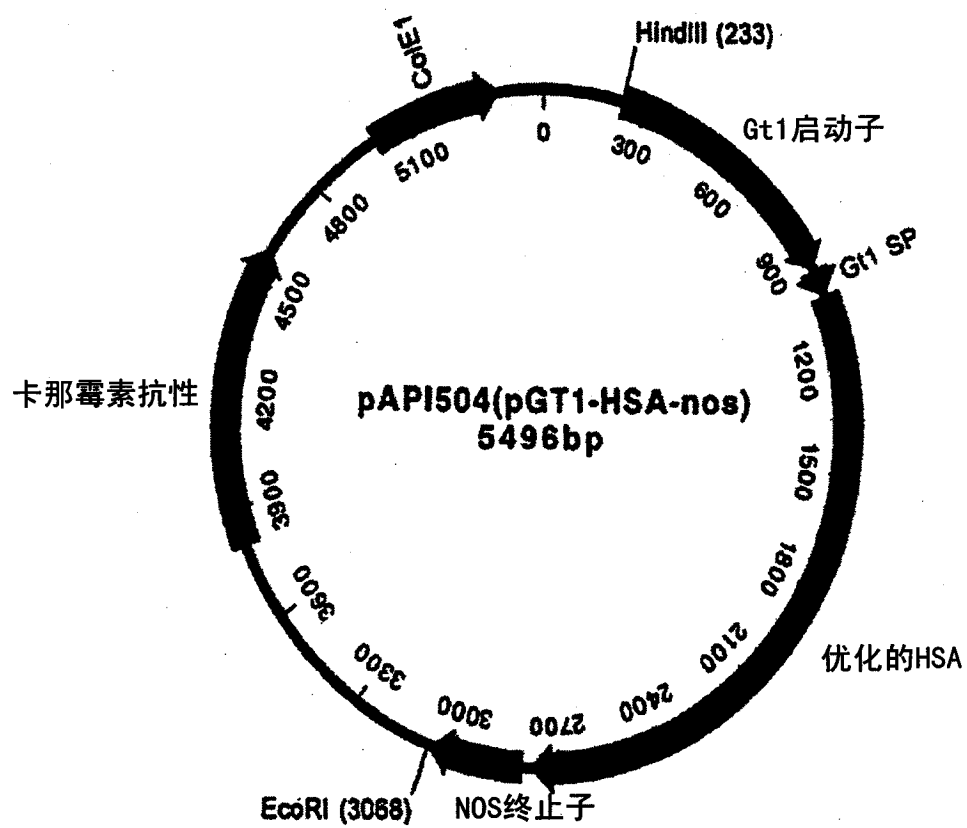


图 6

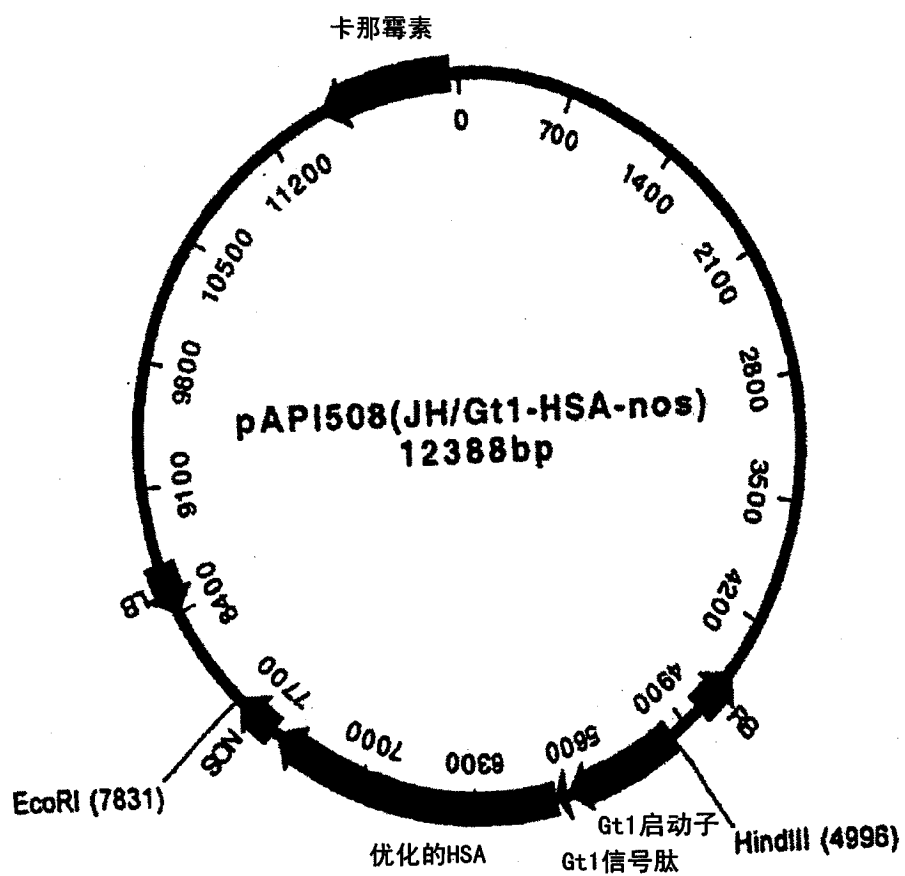
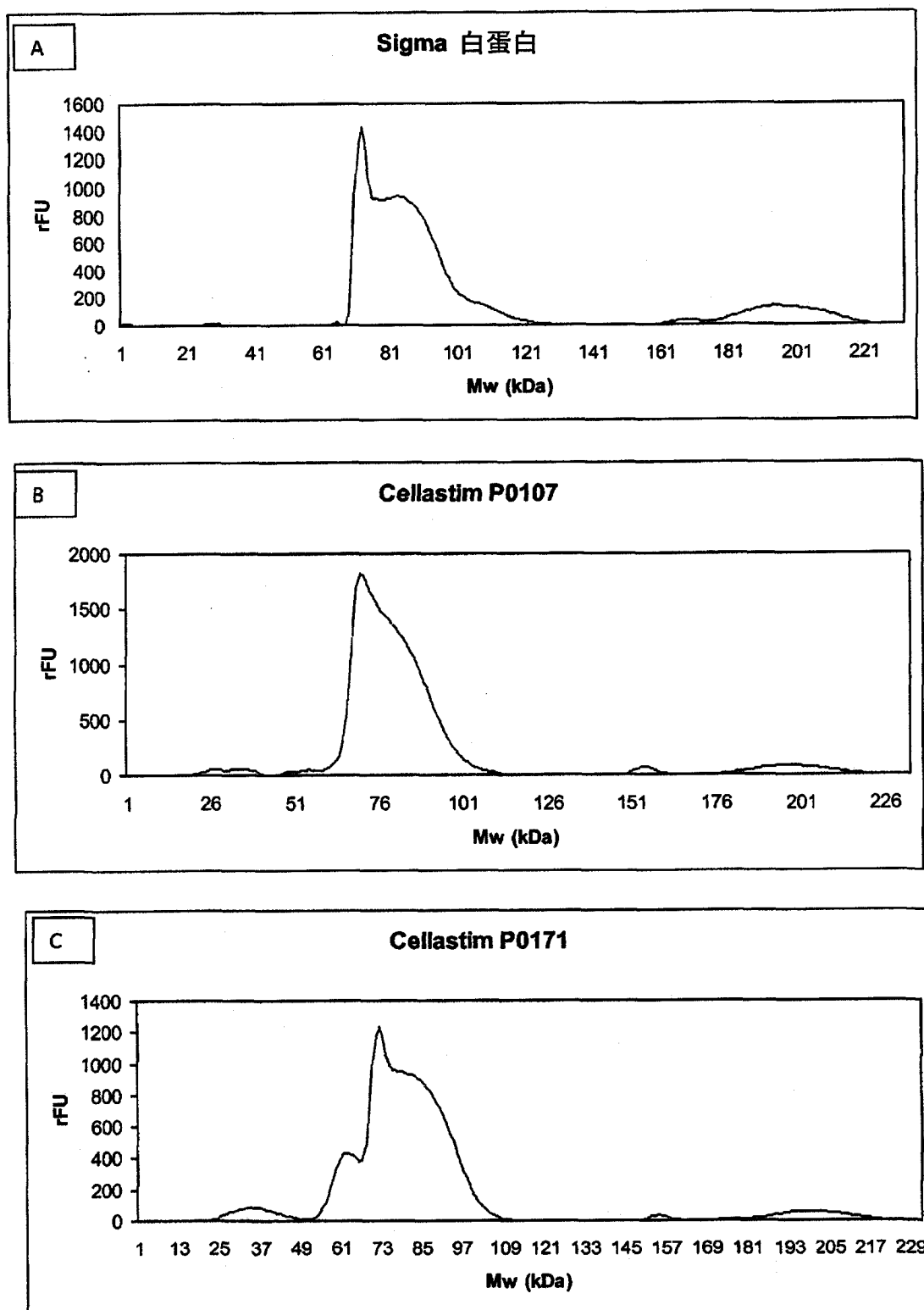


图 7



14

图 8

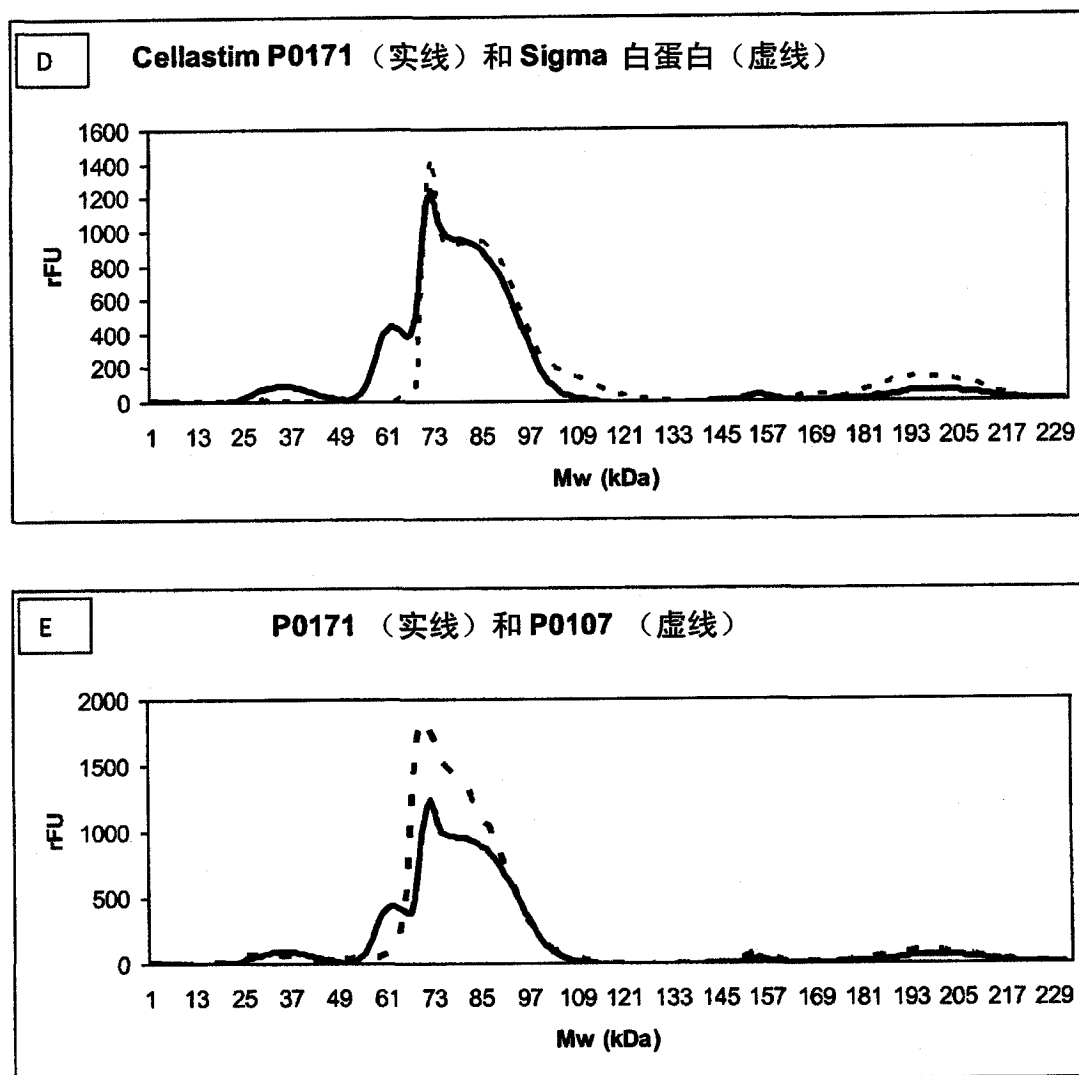


图 8(II)

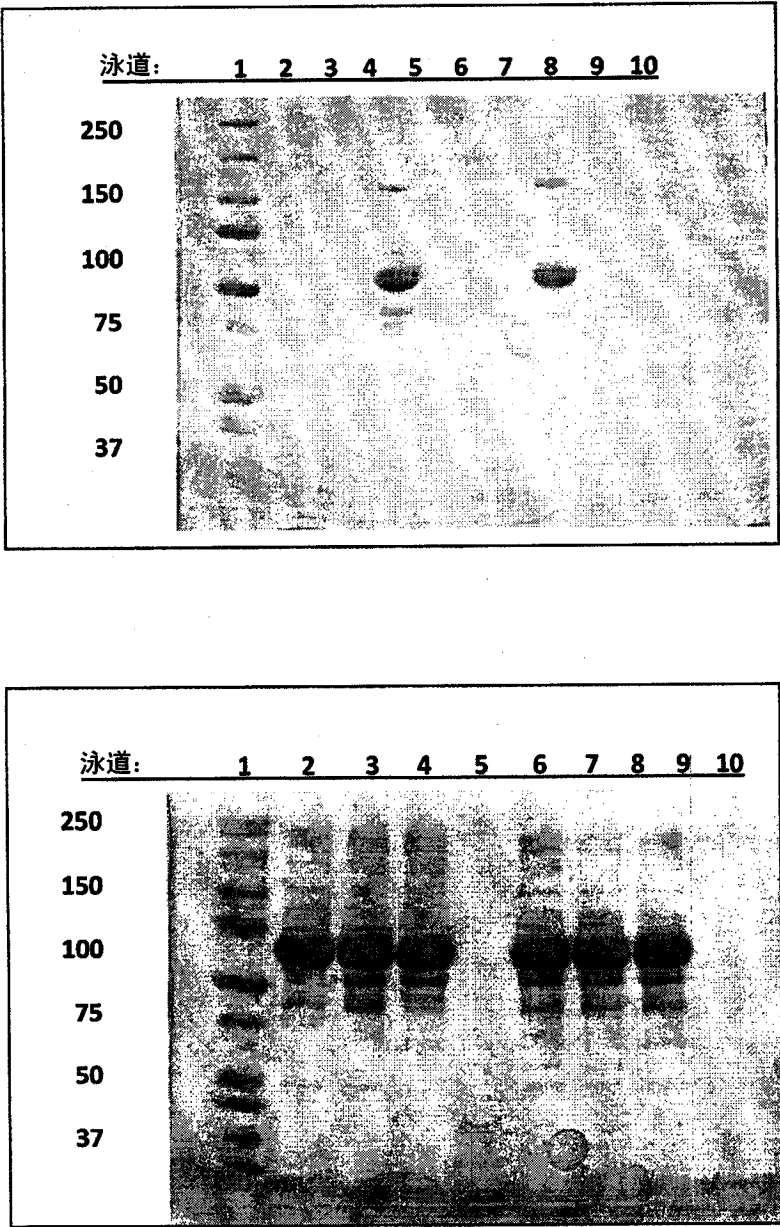


图 9

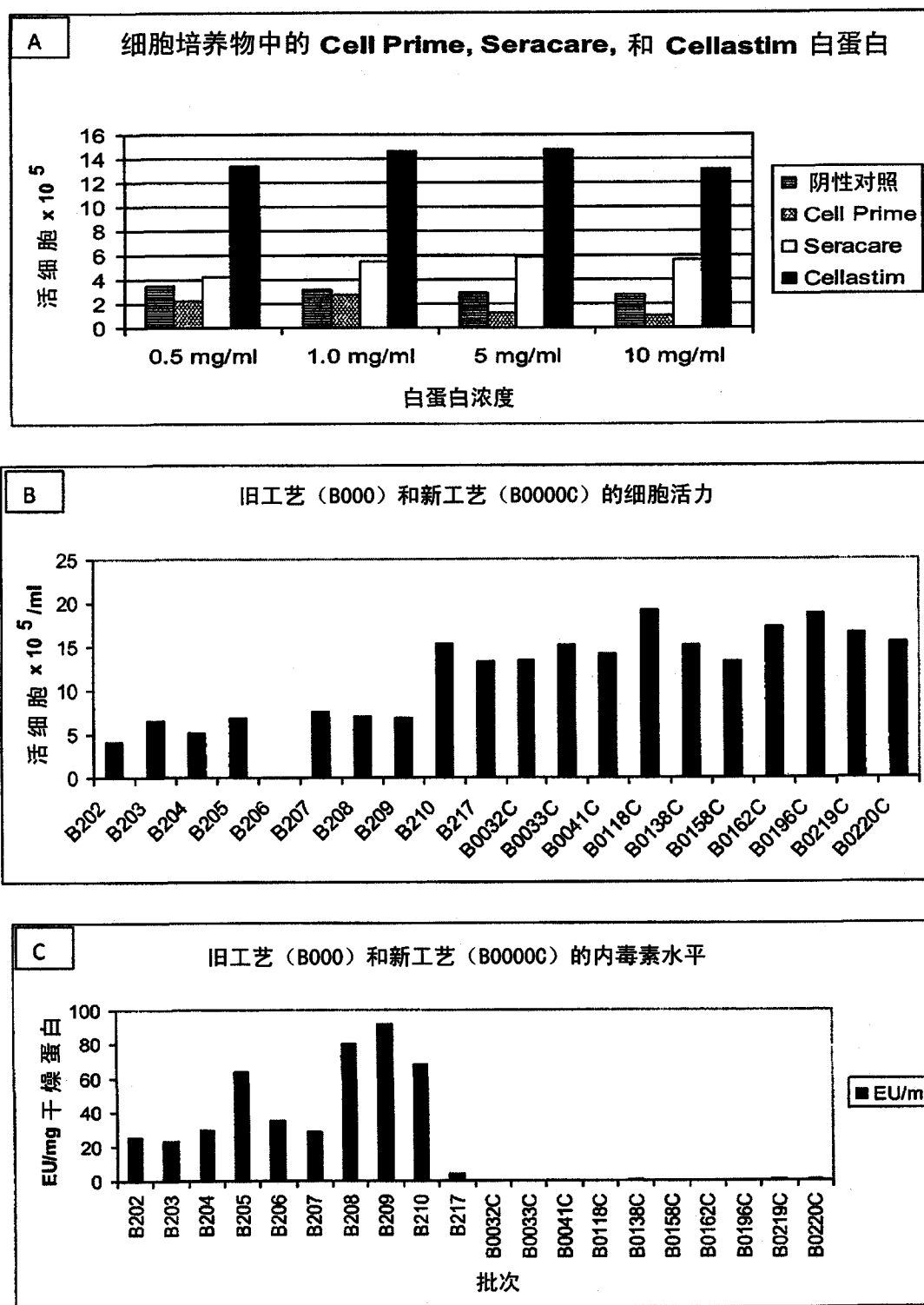


图 10

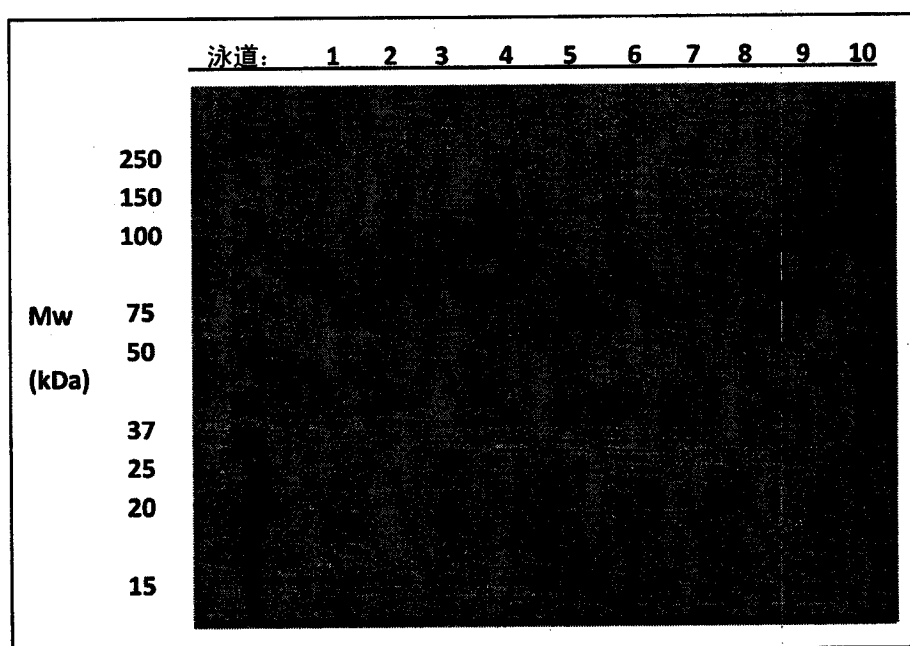


图 11

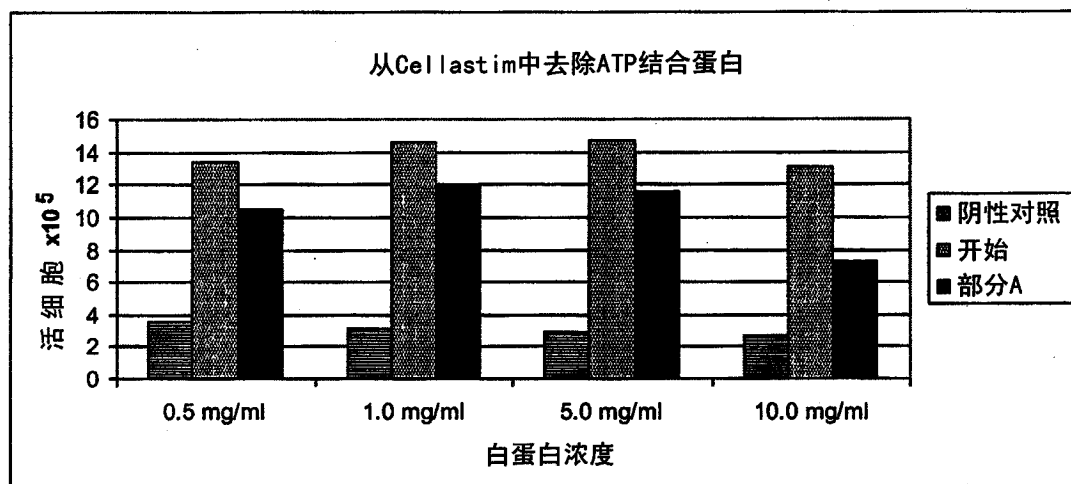


图 12

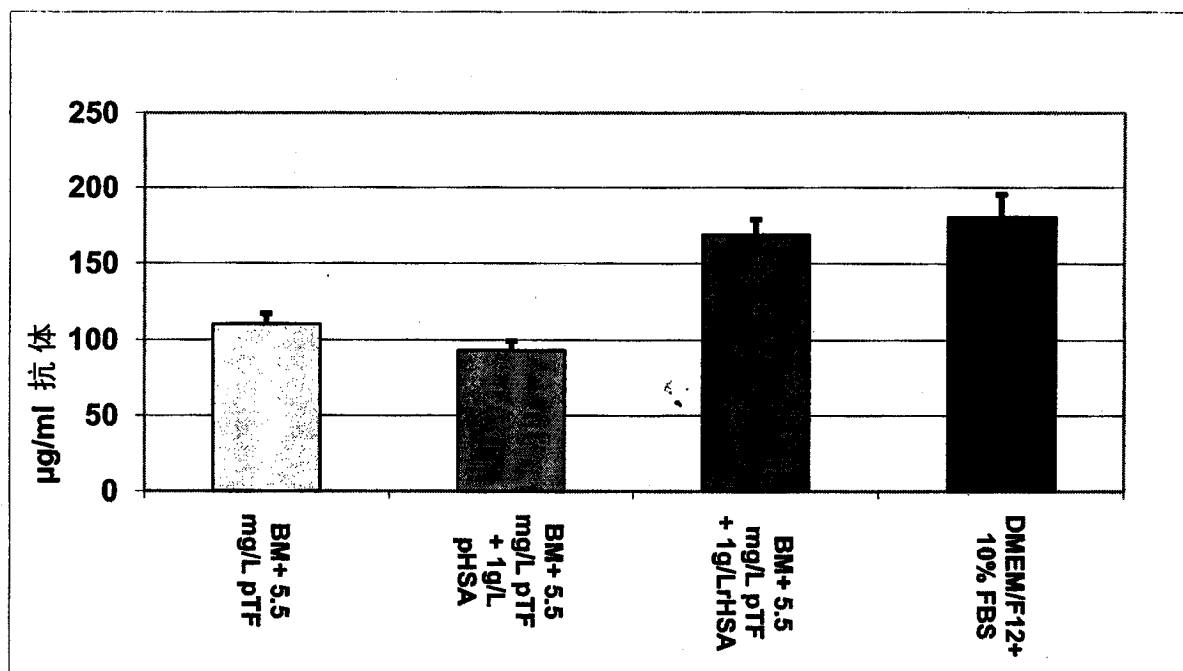


图 13