

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98812925.6

C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/075 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年1月18日

[11] 授权公告号 CN 1237175C

[22] 申请日 1998.11.10 [21] 申请号 98812925.6

[30] 优先权

[32] 1997.11.10 [33] CA [31] 2220563

[86] 国际申请 PCT/CA1998/001055 1998.11.10

[87] 国际公布 WO1999/024592 英 1999.5.20

[85] 进入国家阶段日期 2000.7.4

[71] 专利权人 加拿大农业及农业食品部

地址 加拿大魁北克省

共同专利权人 赫马-魁北克公司 拉瓦尔大学

[72] 发明人 L·-P·维兹纳 S·拉伯格

R·巴津 H·克豪迪

R·莱米乌克斯 G·阿拉德

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 6 页

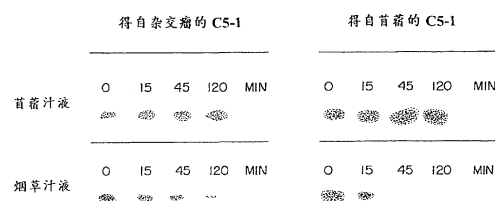
[54] 发明名称

在转基因苜蓿植株中的蛋白生产

[57] 摘要

本发明涉及特征鉴定适用于生产功能性转基因蛋白的宿主系统,所述功能性转基因蛋白用于需要政府管理批准的应用,诸如抗人 IgG。众所周知,管理机构要求用于生产转基因蛋白的主细胞库和主细胞系是稳定和持久的,以确保足够的材料用于合适的特征鉴定、临床试验和潜在的销售。目前的植物生产系统需要建立用于此目的的种子库。然而,有许多缺点与用于生产持续可靠的转基因蛋白的这种系统相关。本发明的一方面涉及特征鉴定适用于符合严格管理要求的转基因蛋白的植物生产系统。本发明的另一方面例举了通过在转基因苜蓿植株中表达相应的基因,生产和特征鉴定用作血清试剂的抗人 IgG。将人 IgG 特异性 IgG2a(κ) 鼠 mAb(C5-1) 的重链和轻链的 cDNA 通过农杆菌感染转移入苜蓿中。获得了表达编码轻链和重链

的 mRNA 的转基因植株,发现来自 F1 子代(通过有性杂交获得的)的植株表达完全装配的 C5-1。此外,所述转基因蛋白在体内以及在提取和纯化步骤期间是稳定的。纯化产生独特的 H2L2 形式,在标准化血清学试验中其反应性不可与杂交瘤衍生 C5-1 的反应性区分。结果表明,植物衍生的转基因蛋白诸如 mAb 可以与杂交瘤衍生的 mAb 一样有效地用作诊断试剂,并且证明转化的苜蓿系统生产大量蛋白(包括诸如 mAb 的多体蛋白)的有用性。



1. 可提取蛋白的稳定生产方法，其包括：
 - a) 提供一种被转化的苜蓿植株，其包含一种载体，所述载体
5 包含编码所述蛋白的基因，其中所述植株的基因型：
 - i) 是多年生的；
 - ii) 显示胚胎发生潜力；
 - iii) 是可转化的；并且
 - iv) 在至少 3 小时期间内在提取物中表现出可忽略的蛋白水解
10 活性；
 - b) 培育所述被转化的苜蓿植株，使所述基因表达以产生所述
蛋白；
 - c) 收获所述被转化的苜蓿植株或被转化的苜蓿植株的子代的
地上部分，所述子代是由所述被转化的苜蓿植株的繁殖体产生的；
 - 15 d) 从步骤 c) 中收获的地上部分的组织中提取所述蛋白；
 - e) 使所述被转化的苜蓿植株或被转化的子代苜蓿植株再生长
地上部分；并且
 - f) 重复步骤 c) 至 e) 以连续地、稳定地提供所述蛋白。
2. 权利要求 1 的方法，在所述提供步骤即步骤 (a) 之前还包
20 括下述步骤：

用含有编码所述蛋白的基因的载体转化所述苜蓿植株，产生被
转化的苜蓿植株，和
确证所述被转化的植株中存在所述基因。
3. 权利要求 1 的方法，其中步骤 d) 中的提取是在没有蛋白酶
25 抑制剂、抗氧化剂、还原剂或稳定剂的条件下进行的。
4. 权利要求 3 的方法，其中步骤 d) 中的提取是在水中进行的。
5. 权利要求 1 的方法，其进一步包括在步骤 c) 的收获之后，
在步骤 d) 的提取之前，干燥收获的地上部分。
6. 权利要求 1 的方法，其中繁殖体是来源于茎的繁殖体。
- 30 7. 权利要求 1 的方法，其中繁殖体是来源于胚的繁殖体。

8. 权利要求 2 的方法，其中所述蛋白是单克隆抗体，所述转化步骤包括用包含编码所述单克隆抗体的重链的基因的载体转化第一苜蓿植株，以产生第一被转化的苜蓿植株，用包含编码所述单克隆抗体的轻链的基因的载体转化第二苜蓿植株，以产生第二被转化的苜蓿植株，然后使第一被转化的苜蓿植株和第二被转化的苜蓿植株杂交，以产生所述被转化的苜蓿植株，其中所述被转化的苜蓿植株同时表达所述单克隆抗体的重链和轻链。

9. 权利要求 1 的方法，其进一步包括在步骤 d) 的提取之后，在步骤 e) 之前，纯化所述蛋白的步骤。

10. 权利要求 9 的方法，其中纯化蛋白的步骤是用亲和层析进行的。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述苜蓿的基因型是 11.9。

在转基因苜蓿植株中的蛋白生产

5 本发明涉及在苜蓿植株中生产转基因蛋白。更具体地讲，本发明涉及转基因苜蓿植株中生产多聚体蛋白，以用于诸如诊断测定的多种应用。

发明背景

10 参考资料的完整出处在实施例部分的结尾列出。

 用于多种药物相关应用的蛋白的使用要符合政府确立的严格管理要求。例如，在美国，生物制品评价和研究中心(CBER)公布了一套文件，概述了关于转基因生产的蛋白的生产和监测的要求(参见 [ftp://www.fda.gov/cber/cberftp/html](http://www.fda.gov/cber/cberftp/html))，在加拿大，有一套相似的与生物

15 制品生产的应用相关的管理条例。CBER 文件指出，应该由可靠的持续的 资源生产生物制品，以确保获得一致的制品 ([ftp://ftp.fda.gov/cber/ptc/ptc_mab.txt](http://ftp.fda.gov/cber/ptc/ptc_mab.txt))。这是因为：在批准所述制品使用之前，必须对所述制品进行多方面测试和验证，并且所述制品必须可以以同样的形式得到以用于未来的销售。有几个建立成熟的表达系统

20 用以生产生物制品，包括：用于细胞培养物的主细胞库、转基因植物的种子库、用于转基因表达系统的病毒种子原种和用于转基因动物的建立者品系。为使用瞬时表达系统必须产生主载体种子原种，并且定期测试所述表达构成物的稳定性。如果要由细胞系生产诸如单克隆抗体的蛋白，则主细胞库和工作细胞库均需要关于亲代细胞系的特征鉴定、细胞生产方案、纯化和质量控制的文件。尤其是如果开始临床试

25 验，对生产或配制的任何改变则需要对主细胞库和工作细胞库以及制品进行广泛的再特征鉴定，因为这些改变可能导致生物活性的显著改变。CBER 文件“用于人类用途的单克隆抗体制品的生产和测试中考

虑的要点”(1997年2月28日)中陈述:“建议用于临床前研究的材料的生产采用的方法应该与用于或计划用于生产临床试验的材料的方法相同”。而且,如果将进行任何扩大生产,例如用于2期研究,则“可能必须证明制品的可比性…这可能需要或不需要额外的临床研究”
5 (ftp://ftp.fda.gov/cber/ptc/ptc_mab.txt),

已经用植物来生产转基因蛋白,然而,以上讨论的适用于主细胞系的维持的考虑同样适用于植物相当物(参见 Miele, 1997)。由于种子不可能无限贮存,因此用于转基因植物的种子库需要定期扩增。种子原种的贮存必须减少对所述目的转基因(the transgene of interest)的潜在的遗传损害。可能影响种子库的任何其它因素也必须加以控制,包括
10 昆虫、真菌或细菌对种子的污染。此外,必须检测所述转基因的稳定性以及产物在一批给定种子的代表植株中的表达水平、或在再扩增种子库后产物在各批种子之间的表达水平。也可能需要比较由不同种子库生产的制品的额外的资料。这后一特征鉴定也适用于鉴定在收获种子原种中年与年之间的变异。一般而言,制品的研制需要持续检测转基因产物的生化特性和生物特性(Miele, 1997)。当这些标准与用以生产多聚体蛋白植物系统结合时,问题复杂化了,因为为了生产能够生产多聚体蛋白的杂交种子,得自各批同源种子、如上概述需要再扩增和维持的转基因植株需要杂交,以生产最终的杂交种子,这又必须如上
15 所述进行维持。显然,需要稳定的并且导致持续供应蛋白、而不需广泛维持多个种子库的替代的转基因蛋白的资源。

在文献中,充分确立了用植物制备转基因蛋白,并且已经建立了几个成功的转化系统。已经通过烟草植株的有性杂交子代生产多聚体蛋白(Hiatt 1990, Hiatt 和 Pinney, 1992; Ma 等 1995),然而,迄今为止,
25 在药学应用方面已经用于转基因蛋白生产的所有植物来源都利用一年生植物。这必需不断地如上所述扩增并且再检验种子库原种。显然,如果利用多年生植物物种来产生转基因蛋白,则可能大大降低总体维持费用和各批之间的变异性。而且,如果收获多年生植物的营养体结

构作为转基因蛋白的来源，则更降低了管理上的要求。为了确保转基因蛋白多年生来源的生产，必须考虑涉及上述关于得自稳定、持续来源的制品的可靠性一致性的要求的许多因素。

5 最重要的血液分组试剂之一是用以检测不凝集型抗体的抗人 IgG 试剂。已经获得了具有合适抗人 IgG 特异性的小鼠 mAb，并用其逐渐取代传统用于 Coombs 试剂的兔多克隆抗人 IgG (St Laurent 等 1993)。这些 mAb 用 B 细胞杂交瘤的大规模培养物生产。尽管该方法可靠，但该方法很昂贵，因为它需要复杂的设备、昂贵的培养基和受过训练的人员。与 mAb 其它诊断应用相比，用于血库测试的蛋白的市场是高度竞争性的；因此蛋白的价格相对低，并且 mAb 生产的成本效率已成为关键的问题。

10 编码 mAb 轻链和重链的 cDNA 克隆的分离，已经允许抗体基因在各种异源系统中表达，所述异源系统包括细菌、真菌、昆虫细胞、植物和非淋巴类哺乳动物细胞(Wang 等 1995; Wright 等 1992)。在这些系统中，植物看来是成本效率方面最有前途的系统之一。然而，根据烟草中的初步证明，重要的是发现使该技术可以满足市场性的现代要求的作物。Hiatt 等(WO 96/21012, 1996 年 7 月 11 日公开)公开了用于在植物中制备用于抗真菌病原体的治疗免疫球蛋白(“保护蛋白”)的方法。在 EP 0 657 538 中，Galeffi 和 Natali 公开了用于治疗或诊断应用、识别乳房肿瘤和卵巢肿瘤中存在的 HER-2 癌基因的抗体的生产。重要的是发现可以生产重组蛋白、且可以满足对市场性的现代要求的作物。这些要求不仅包括生产成本的竞争性，而且包括可靠性，这暗示：除非可以建立长期稳定的纯化重组分子的供应，否则必须开发一些方法，确保可以衍生克隆群体的认可的源材料的持久性(perenniality)。

25 对于 B 细胞杂交瘤，通过建立主细胞库确保持久性，所述主细胞库包括取自同源库并在液氮中冷藏的等份细胞。Hiatt (1990) 提出，苜蓿、大豆、番茄和马铃薯作为繁殖抗体的宿主可能是有用的供替代的选择。苜蓿是在目前农业生态系统中生产的最便宜的植物生

物质之一，在大多数气候条件下的其多年生性使得它成为持续农业的有吸引力的作物。而且，苜蓿(*Medicago sativa* L.)不需要每年耕种和栽种，并且建立成熟了残留植物组织用于动物饲料的用途(Austin 和 Bingham, 1997)。然而，几项研究已经检查了青贮饲料物种中蛋白水解的程度，已知蛋白水解在豆科植物饲料物种中比禾本科植物物种中更加广泛，而苜蓿显示最高水平和程度的蛋白水解(Jones 等 1995; Papadopoulos 和 McKersie, 1983)。此外，本领域众所周知，不是所有的苜蓿植物都是多年生的，在多年生苜蓿植物中，不是所有的均适合于转化方案(Desgagnés, 1995)。

10 在文献中已经已经关注到转基因蛋白在植物组织中以及在提取时的稳定性。然而，对于抗体在植物细胞系统中的稳定性知之甚少(Wongsamuth 和 Doran, 1997)。数位研究人员(Hiatt 等(1989)、During 等(1990)、Ma 等(1995)、Ma 和 Hein (1995)、Schouten (1996))已经观察到，包含指导构成物在内质网中共同翻译插入的信号序列的嵌合构成物，提高构成物在转基因植物中的稳定性。在缺乏前导序列的情况下，15 转基因蛋白的得率非常低(Hiatt 等, 1989)。通常的作法是，在提取混合物中包括蛋白抑制剂，以便将来自转基因植物组织的蛋白得率最大化。然而，由植物适合市场地生产转基因蛋白需要简单性。例如，Austin 和 Bingham (1997)综述了于田间位点的大规模浸渍和汁液提取方案，20 并且数小时后于加工厂进行加工。这类方案使用水和机械浸渍，并且如果提取物中的蛋白水解严重，或如果在提取期间需要蛋白酶抑制剂，则这类方案可能不可行。对于已知尤其在收获后表现出高速率蛋白水解的苜蓿物种的应用而言，尤其如此(Jones 等 1995; Papadopoulos 和 McKersie 1983)。

25 目前 1 公斤的 mAb 的市值为\$1,000,000-\$10,000,000。在当预期产量为每年 100 g 的 250 m²的温室条件下，估计产生的每克 C5-1 的生产成本(包括用于提取和纯化的加热、人力和消耗品在内)时，每克 C5-1 的成本将为\$500-\$600，而产生的市值为\$400,000。这类估计表明，在

植物中可以成本有效地生产重组蛋白，然而，需要建立合适的植物系统。本发明一个实施方案的一个方面涉及确定合适转基因植物系所需的特性，所述转基因植物系可以用来生产符合 CBER 建议书中建立的关于生物制品化合物标准的目的转基因蛋白。

5

发明概述

本发明涉及在苜蓿植物中生产转基因蛋白。

本发明也涉及生产用于血清学测定的蛋白的方法，包括用编码所述蛋白的目的基因转化苜蓿植株，并选择表达所述蛋白的转化苜蓿植株或选定苜蓿植株的子代，以及从转化植株提取所述蛋白。本发明一个实施方案的一个方面涉及用亲和层析纯化所述蛋白。

10

本发明也涉及用于红细胞血清学的单克隆抗体的生产方法，包括：

15

a) 用包含编码单克隆抗体的基因的载体转化苜蓿，以产生转化体，

b) 根据所述转基因基因的存在选择转化体，

c) 培育所述转化体，以生产由所述转基因基因编码的单克隆抗体，

d) 收获所述转基因苜蓿植株的地上部分，

20

e) 从所述转基因苜蓿的所需组织提取所述单克隆抗体，

f) 让所述转基因苜蓿植株再生长，和

g) 重复步骤 c)-f)，

25

并且可任选地复制所述转基因植株。本发明也涉及该方法，其中可任选的繁殖所述转基因植物的步骤包括任何无性繁殖方法，包括茎繁殖或胚胎发生繁殖。本发明一个实施方案的再一方面涉及用亲和层析纯化所述单克隆抗体。

本发明也包括用该方法生产的单克隆抗体。

本发明也涉及在转化苜蓿中生产目的蛋白的方法，包括：

- a) 用含编码目的蛋白的基因的载体转化合适的首蓆基因型，以产生转化体，
- b) 根据所述转基因基因的存在筛选合适的转化首蓆基因型，
- c) 培育所述转化的合适首蓆基因型，以生产所述目的蛋白，
- 5 d) 收获所述合适的转基因首蓆基因型的地上部分，
- e) 从所述合适的转基因首蓆基因型的所需组织提取所述目的蛋白，
- f) 让所述合适的转基因首蓆基因型再生长，和
- g) 重复步骤 c)-f)。

10 本发明也涉及能够表达多聚体生物活性蛋白的转基因首蓆植株。

尽管本发明以单克隆抗体 C5-1 的制备作为实例，但实际上可以按照本发明的方案在转化首蓆中制备任何目的产物。现有技术中尚未公开过的、采用合适的首蓆基因型来表达转基因蛋白的优点，包括蛋白

15 在以下部分中的稳定性：

- 1) 收获的组织，得自所述植株并让其风干，且在提取之前贮存；
- 2) 在水中收获的提取物，所述提取物于室温下且在缺乏以下物质的情况下收获：稳定剂、蛋白酶抑制剂、缓冲剂、盐、抗氧化剂、还原剂、稳定剂或通常加入提取混合物中以确保蛋白稳定性和活性的其它添加剂；
- 20 3) 在生长季节内和生长季节之间的同一植株过度重复收获物；和
- 4) 无性繁殖体。

此外，因为首蓆是多年生植物，能够营养繁殖，所以在跨越许多生长季节的相当长的时间内可以获得并收获无性材料。这确保在转基因首蓆内目的蛋白的稳定来源。在用于转基因蛋白生产的其它常用的

25 植物内没有发现这类特征，所述常用的植物往往是一年生植物，包括烟草、拟南芥属、大豆和玉米。然而，不是所有的首蓆变种均是多年生的，并且已知许多多年生且高产(从农艺上讲)的变种不适合于转化

方案。因此，本发明也涉及用于生产转基因蛋白的合适的首蓿系或基因型的选择方法，所述方法包括：

- a) 筛选首蓿基因型或品系的文库，以确定多年生的基因型或品系；
- 5 b) 根据胚胎发生潜力筛选在(a)中鉴定的所选择的品系或基因型；
- c) 根据转化能力筛选在(b)中鉴定的所选择的品系或基因型；
- d) 根据转基因蛋白的稳定性筛选在(c)中鉴定的所选择的品系或基因型。

10 本发明也涉及合适的首蓿基因型或得自所述合适的首蓿基因型的繁殖体，用于生产在符合生物制品管理批准要求方面有用的转基因蛋白。所述合适的首蓿基因型在特征在于：为多年生的，表现出为胚胎发生潜力，可被转化，且不降解所述转基因蛋白，使得所述蛋白在体内在干燥的气生组织中以及在提取步骤期间是稳定的。此外，本发
15 明包括所述合适的首蓿基因型的繁殖体，包括无性衍生的繁殖体诸如茎，或胚胎衍生的繁殖体。

附图简述

20 根据以下说明，参见附图，本发明的这些特征和其它特征将变得显而易见，其中：

图 1 显示 C5-1 mAb cDNA 在转基因首蓿植物中的表达。由转基因植株和对照植物分离的总 RNA (15 μ g/泳道)在 1%琼脂糖甲醛凝胶上分离，并转移至 Hybond-N 尼龙膜。转录物的大小以千碱基显示。通过于-70 $^{\circ}$ C 曝光 24h，产生放射自显影图。图 1A，将用 pGA643- κ cDNA
25 转化的植株的提取物与得自 κ cDNA 的放射标记探针(600 bp)杂交。1、2 和 4-9 道含有得自转基因植株的 RNA 提取物；3 道含有得自非转化基因型 11.9 的 RNA。图 1B，将用 pGA643- γ 的植株的提取物与完整的放射标记的 γ cDNA 杂交。1-5 道含有得自转基因植株的 RNA 提取物；

6道含有得自非转化的11.9的RNA。图1C，将所述F1子代植株的提取物与 κ 和 γ 探针的混合物杂交。1-5道和7道含有得自转基因植株的RNA提取物；6道含有得自非转化的11.9的RNA。

5 图2显示C5-1肽在单转基因苜蓿植株和双转基因苜蓿植株中的表达和装配。不用巯基乙醇，在Tris-HCl (50 mM)、PMSF (2 mM)和NaCl (150 mM)的存在下提取蛋白。将蛋白经SDS PAGE分离，并电转移至硝酸纤维素膜上。通过用兔抗小鼠IgG，然后用偶联于过氧化物酶的抗兔IgG，在印迹上检测C5-1肽。用Boehringer Mannheim BM化学发光试剂盒，经化学发光检测到过氧化物酶活性。L道：得自表达 κ cDNA的亲代植株的蛋白提取物。H道：得自表达 γ cDNA的亲代植株的蛋白提取物。F1道：得自既表达 κ cDNA也表达 γ cDNA的F1子代的蛋白提取物。Hyb道：由杂交瘤细胞分离的C5-1 mAb。

15 图3显示植株C5-1的纯化。图3A，由膨胀床亲和层析(STREAMLINE™-r蛋白A基质)纯化的C5-1的洗脱分布图。每个流分含有1.5 ml流出液，由这些流出液每道上样20 μ l，图3B，并在非还原条件下在SDS-PAGE上分离，并用考马斯蓝染色。

20 图4显示在苜蓿叶或烟草叶的情况下共同提取的C5-1蛋白的蛋白质印迹。在2 μ g转基因植物或杂交瘤培养物生产的C5-1的存在下，提取2克苜蓿叶或烟草叶组织。于0℃用10 ml水进行提取，于20,000 \times g离心，并于25℃温育至多3小时，然后进行蛋白质测定，以测定提取溶液中残留的C5-1的量。

25 图5显示得自表达C5-1的双转基因苜蓿植株地上部分的蛋白的蛋白质印迹，将所述地上部分切割并让其于室温下干燥至多5天。将等量的收获组织于20%的相对湿度下保持0h、7h、1天、2天和5天，然后提取并确定蛋白分布图(图5A)，并用蛋白质分析测定C5-1的水平(图5B)。

图6显示在静脉内注射后的一个月时期内植物衍生的C5-1 (●)和杂交瘤衍生的C5-1 (○)在小鼠中稳定性。用抗固定化人IgG的ELISA

进行检测。

优选实施方案的描述

本发明涉及在转基因苜蓿植株内生产蛋白。

5 按照本发明，“目的基因”是指能够编码蛋白的基因。然而，该定义也适用于其混合的转录和翻译产物导致产生多聚体蛋白的目的基因，所述多聚体蛋白用作生物制品，诸如血清学测定内的生物制品。可以采用既立的方案(例如 Desgagnés 等, 1995)，用目的基因转化苜蓿。尽管苜蓿基因组的复杂性，但通过农杆菌介导的基因转移获得的

10 性状是稳定的，并按照简单的孟德尔模式进行有性传递(Desgagnés 等, 1995)。这种特征对于生产的蛋白(包括多聚体蛋白在内)是必需的。尽管不希望限制可以用本发明以任何方式生产的蛋白的类型，但多聚体蛋白的一个实例可以是 mAb，诸如 C5-1。以下例举该蛋白的生产 and 特性。

15 “启动子”是指在所述启动子区控制下基因表达的起始和调节方面有活性的 DNA 序列区，正如本领域技术人员所通常理解的。该 DNA 序列通常在结构基因编码序列的上游(5')，通过为 RNA 聚合酶和/或使转录于正确位点起始所需的其它因子提供识别，而控制所述编码区的表达。

20 一般有两种类型的启动子，即诱导型和组成型。“诱导型启动子”是能够直接或间接激活一种或多种 DNA 序列或基因对诱导物应答而转录的启动子。在缺乏诱导物时，所述 DNA 序列或基因将不被转录。通常，特异性地结合于诱导型启动子以激活转录的蛋白因子以无活性形式存在，然后被诱导物直接或间接地转化为活性形式。诱导物可以是化学因子，诸如蛋白、代谢物、生长调节剂、除草剂或酚类化合物，

25 或是由热、冷、盐或毒性成分直接施加的生理胁迫，或通过病原体或诸如病毒的致病因子的作用间接施加的生理胁迫。通过将诱导物诸如通过喷洒、浇水、加热或类似的方法外部应用于所述细胞或植物，可

以将含有诱导型启动子的植物细胞暴露于所述诱导物。另外，诱导型启动子包括组织特异性启动子，它们以组织特异性方式起作用，以在所述植物的选定组织中调节目的基因。这类组织特异性启动子的实例包括种子、花或根特异性启动子，它们也是本领域众所周知的。

5 “组成型启动子”是指指导基因在植物的所有不同部分并且在整个植物发育中持续表达。已知的组成型启动子的实例包括与 CaMV 35S 转录物和农杆菌 Ti 质粒胭脂碱合酶基因相关的启动子：

本发明的基因构成物包括 3'非翻译区。3'非翻译区是指基因包含这样的 DNA 区段的部分，所述 DNA 区段含有多腺苷酸化信号和能够实现 mRNA 加工或基因表达的任何其它调节信号。所述多腺苷酸化信号的特征通常为：实现将多腺苷酸积加至 mRNA 前体的 3'端。根据存在与规范形式 5'AATAAA-3'的同源性而识别多腺苷酸化信号，尽管变异是常见的。合适的 3'区的非限制性实例是含有以下基因的多腺苷酸化信号的 3'转录的非翻译区：农杆菌肿瘤诱导(Ti)质粒基因诸如胭脂碱合酶(*Nos* 基因)，和植物基因，诸如大豆贮藏蛋白基因和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基(*ssRUBISCO*)基因。

本发明的基因构成物也可以包括其它可任选的调节基元，诸如可能是需要的增强子或者为翻译增强子或者为转录增强子。这些增强子区对于本领域技术人员是熟知的，可以包括例如 35S 调节区的增强子区以及得自其它调节区的其它增强子和/或 ATG 起始密码子和相邻序列。起始密码子必须符合编码序列的读框，以确保翻译完整的序列。翻译控制信号和起始密码子可以得自多种起源，包括天然和合成的。翻译起始区可以由转录起始区源提供，或由结构基因提供。所述序列也可以得自选择以表达所述基因的增强子，且可以被特异性地修饰，

20 以增加所述 mRNA 的翻译。

25 为有助于转化植物细胞的鉴别，还可以操作本发明的构成物，以包括植物选择标记。有用的选择标记包括但不限于提供对抗生素抗性的酶，所述抗生素诸如庆大霉素、潮霉素、卡那霉素等。同样，提供

产生可根据颜色变化鉴别的混合物的酶诸如 *GUS* (β -葡糖醛酸糖苷酶) 或提供产生可根据发光鉴别的化合物的酶诸如荧光素酶是有用的。

本发明也考虑了含有本发明嵌合基因构成物的转基因植物。本发明也涉及得自表达目的基因的转基因植株的部分，例如叶、茎、种子、
5 花或根。这些选定的植物部分可以得自用包含或者组成型或者诱导型启动子的载体转化的植物。由植物细胞再生整个植株的方法是本领域已知的，获得转化和再生的植株的方法对于本发明不重要。一般而言，在合适的培养基中培养转化的植物细胞，所述培养基可以含有诸如抗生素的选择剂，在此选择标记用来便于转化植物细胞的鉴别。一旦形
10 成愈伤组织，则可以通过利用合适的植物激素，按照已知方法，促进形成胚胎或苗，并且将苗转移至生根培养基以再生植株。然后，可以或者由种子或者采用营养繁殖技术用所述植株建立重复世代。

可以采用 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、微注射、电穿孔等，将本发明的构成物引入植物细胞中。关于这类技术的
15 的综述，请参见例如 Weissbach 和 Weissbach (1988) 和 Geier 和 Corey (1988)。本发明还包括包含所述嵌合基因构成物和参与所述基因构成物表达的相关 5' 和 3' 调节区的合适的载体。

“合适的首蓿系”或“合适的首蓿基因型”是指多年生的、表现出胚胎发生潜力(例如每 20 个叶圆盘或其它外植体组织至少 1 个胚胎
20 发生愈伤组织)、可转化并且其中根据所述文件讨论的稳定性标准(参见实施例 3)转基因蛋白是稳定的首蓿基因型或系。不是所有的首蓿基因型或系都是多年生的，众所周知，许多首蓿多年生基因型或系是不能进行胚胎发生的，并且不能转化，或者这些特性在转化后可能改变 (Desgagnés, 1995)。即使由于先前所述的优点，首蓿植株看来作为宿主
25 植株是有前途的，但已知首蓿植株表现出高蛋白酶活性。事实上，在表征的饲料物种中，豆科饲料在青贮中表现出比禾本科物种更高程度和速率的蛋白水解，而首蓿在豆科饲料中显示最大程度和最高速率的蛋白水解(Jones 等 1995)。而且，已经证明，在诸如烟草的其它植物物

种中，转基因蛋白易于被内源蛋白水解活性降解(例如 Hiatt 等, 1989)。当人们综合考虑这两种因素时，完全未预料到，可能分离出表现出确保转基因蛋白稳定性的特性的合适的首蓆基因型。因此，重要的是确定合适的首蓆基因型中任何蛋白水解活性是否针对所述植株中生产的
5 目的转基因蛋白。为了确保可接受的蛋白水解活性，应该获得某些最低标准。这些最低标准将根据所述转基因蛋白的应用需要而变化。例如，如果需要大量的所述转基因蛋白，则所述蛋白应该在水性提取物中是稳定的，最好在缺乏任何加入的组分(诸如蛋白酶抑制剂)或通常加入提取溶液中的其它试剂的情况下是稳定的。也可能要求：所述转
10 基因蛋白在干燥过程中和干的收获的组织中是稳定的，便于大规模收获所述植物。

通过筛选首蓆植物文库，以确定多年生的首蓆植株，然后根据胚胎发生潜力筛选这些选定基因型或系，然后根据转化能力筛选选定的基因型或系，而获得合适的首蓆基因型或系。然后，用目的蛋白转化
15 这些植株，并测定所述蛋白在粗提取物中和在干燥的气生组织中的稳定性。然后，可任选地，验证转基因蛋白用作生物制品的实用性。为了举例说明本发明，表征一个胚胎发生首蓆基因型 11.9，然而，也可能已经使用了其它基因型。确立该基因型为多年生、胚胎发生、可转化的并且如下指出的，表现出可忽略的针对转基因蛋白的蛋白水解活
20 性。然而，人们会理解，该基因型将被认为是可以采用上述标准选择的可能的首蓆基因型或系的一个实例，并且该基因型不意味着在筛选方法应用或由于该筛选方案获得的植株方面是限制性的。

为了研究可以用于试剂中的目的蛋白的成本有效的制备方法，考虑了在合适的首蓆基因型或系中生产转基因蛋白。因为已经证明 mAb
25 C5-1 可用于红细胞血清学，所以由杂交瘤细胞 cDNA 文库克隆了 C5-1 重链和轻链，并且在转化首蓆植株之前将其置于 35S 启动子控制之下(参见实施例 1)。然而，人们会理解，该 mAb 以及 35S 启动子的应用可以分别作为可以使用并在合适的首蓆基因型或系中生产的嵌合基

因构成物和蛋白的一个实施例提供，并且该实施例决不是限制性的。

通过RNA印迹分析(图1)和蛋白质印迹分析(图5)证实所述基因在转基因组织中表达，确定C5-1在合适的转基因苜蓿植株中的表达。通过提取组织的蛋白质印迹测定，所述转基因表达的mAb在于室温下或在5 在大田条件下经数天干燥的气生组织中是稳定的(实施例3，图5)。当在苜蓿叶的情况下共同提取时，该mAb也是稳定的，而与烟草叶共同提取C5-1时，该mAb显著低(实施例3，图4)。当其它抗体与苜蓿共同提取并在一段时间内温育时，也观察到类似的结果(参见实施例3，表1和表2)。此外，当静脉内注射给小鼠时，由植物衍生的C5-1表现出与由杂交瘤衍生的C5-1相同的稳定性(图6)，表明由于植物衍生蛋白的糖基化如同杂交瘤衍生蛋白的糖基化，因此获得类似程度的保护。如果考虑采用苜蓿大规模生产和收获目的蛋白，则由于这类方法通常使收获的组织暴露于长期的风干和简单的水性提取方案，所以这些特性是重要。

15 已知某些苜蓿变种的营养结构表现出低水平的鞣质(Morris 和 Robbins 1997)。尽管不希望受理论的束缚，但这些苜蓿组织提取物中蛋白的稳定性提高可能是酚类化合物和鞣质水平降低的结果。已经发现这些特征限制了苜蓿作物饲料作物的应用，正在进行的第一步是提高该植物中酚类化合物的水平，以提高其作物饲料的效率(Morris 和 Robbins 1997)，然而，这些特性对于本发明公开的目的是有益的。

20 采用粗制澄清的提取物的亲和层析纯化植物C5-1，在用考马斯蓝染色时，表明最终的制备物无污染(参见实施例2)。对于先前报道的方法(例如 During 等 1990)这是一个显著的改进。在纯化过程期间也没有明显的C5-1损失，因此由植物中的C5-1至纯化的C5-1的得率估计25 超过70%。

当在ELISA和标准化血细胞凝集测定中测试时，纯化的植物衍生C5-1的免疫反应性与其得自杂交瘤细胞的对应物类似。虽然在粗提取物中存在几种装配类型，但所公开的纯化方法产生的H2L2形式用作

杂交瘤衍生 C5-1 在血清学试验中的反应性应答方面不可区别。这表明，植物 C5-1 可以与杂交瘤衍生的 C5-1 一样有效地用作诊断蛋白。

5 为了批准基于 mAb 的蛋白，管理机构要求：用于 mAb 生产的活材料必须是稳定的，以确保所述生物活性分子的质量和产量不随时间而变化(www.fda.gov/cber/cberftp/html; Miele, 1997)。通过测定由 F1 子代两个基因型获得的再生体内 C5-1 的浓度，并比较这些浓度与亲代材料内的浓度(参见实施例 3)，检查植物繁殖体之间 C5-1 的稳定性。这些结果表明，植物组织内 C5-1 的浓度在繁殖体之间保持恒定，并且这类转基因苜蓿系看来是稳定的 C5-1 mAb 源。可以体外引入如 11.9 的
10 具有高胚胎发生潜力的基因型，来以高比率产生无性繁殖体。可以使所述繁殖体进入休眠、干燥至 15-20%含水量，用人工胚乳包被，并于 -80℃ 贮藏(McKersie 和 Bowley, 1993)。该克隆材料可以保持数年而不显著丧失萌发潜力，因此构成了回收(retrieve)与原始活材料相同的材料以起始新的生产循环的细胞库。也设想：本领域技术人员已知的无性繁殖体的其它来源可以用来持续繁殖合适的首蓿基因型。其它来源
15 可以包括但不限于：胚、茎或能够繁殖的其它营养结构。

此外，因为苜蓿是多年生植物且能够营养繁殖，所以可以获得无性材料，并在跨越许多生长季节的相当长的时间内直接从大田收获。这意味着一棵植株可以在 10 年或 10 年以上的时间内重复收获。同一
20 原种材料的这种再生能力和可更新有效性，确保了在转基因苜蓿中目的蛋白的一致来源。在通常用于转基因蛋白生产的其它植物中，诸如在烟草、拟南芥、大豆、玉米或许多首蓿基因型或系中，没有发现这类能力和特征。

25 作为植物体(plantibody)策略商业应用，在转基因苜蓿中大规模生产 C5-1 mAb 是非常有前途的，因为与包括其它植物在内的许多异源系统相比，它代表一个经济的选择。而且，应用合适的首蓿基因型提供最大限度降低根据生物制品的批准和临床试验所需的特征鉴定和维持细胞库的成本的能力。

在大田规模方面，成熟苜蓿植物地段有 $1-3 \times 10^6$ 单株/公顷；这确立了无性繁殖体的生产成本为约\$8,000。根据我们对繁殖的转基因苜蓿中抗体含量的估计(0.13-1.0%总可溶性蛋白)，每年一公顷的产量将为 500-1000g。苜蓿是多年生作物，这种植物的田间生产性能可以维持 3-4 年。这将使得在开放耕地利用(open-field exploitation)方面所述原料的生产成本为\$3,000/kg mAb。用常规杂交瘤细胞培养物(约 50 mg C5-1 mAb/L)生产 1 kg C5-1 mAb 的生产成本估计为约 2×10^6 美元。即使将杂交瘤培养物的抗体产量提高 20-40 倍，降低的成本(约 750,000\$/kg)仍显著高于植物衍生的 C5-1。

关于从转基因植物大规模纯化 mAb 尚未有报道。先前的关于纯化植物衍生 mAb 的报道表明，纯化为均质在亲和层析前后需要复杂的操作(During 等 1990)。利用膨胀床吸附层析，有助于按比率扩大本发明的纯化方法。该技术在缩短的时间范围内，由大体积的粗略澄清的提取物产生纯化的肽，因此看起来开创了降低从胶体提取物的纯化成本的新方法。

此外，用得自杂交瘤细胞培养物的未纯化上清液制备 Coombs 试剂，因此，如果观察到部分纯化的植物制备物于 4°C 的较长的稳定性，则它们可能适用于这种诊断。

20 实施例

得到以下方法，来选择用于生产目的转基因蛋白的合适的苜蓿基因型或系。在随后的实施例中更详细地描述该方法的不同步骤。该方法包括：

- (a) 筛选苜蓿基因型文库，以确定多年生的基因型或系；
- (b) 根据胚胎发生潜力筛选在(a)中鉴定的选定的基因型或系；
- (c) 根据转化能力筛选在(b)中鉴定的选定的基因型或系；
- (d) 根据所述转基因蛋白的稳定性筛选在(c)中鉴定的选定的基因型或系。

植物材料

根据具有胚胎发生潜力和转化能力的多年生苜蓿的选择，我们先前已经鉴定了基因型 11.9，该基因型分离自商用育种系(Desgagnés 等, 1995)。为了进一步确保根据以上标准选择的植物的适用性，应用该基因型作为模式系统进行试验，以举例说明本发明的实用性。然而，该基因型的用途决不被认为是限制性的。应用基因型 11.9 是为了举例说明选择方案和具有所需特性的选定植株的特性。人们会理解，以上选择方案可以用来选择其它苜蓿基因型或系。

10 细菌菌株、双元载体

大肠杆菌菌株 DH5 α 用于 DNA 克隆。用根癌农杆菌的解甲章鱼碱菌株(LBA4404)进行植物转化。双元植物表达载体 pGA643 用于 DNA 转移(An 等 1988)。

15 C5-1 杂交瘤细胞系的选择

通过将 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞与用人 IgG 超免疫的 Balb/c 小鼠的脾细胞融合，制备杂交瘤细胞系。如先前所述(St Laurent 等 1993)，根据上清液针对弱致敏的红细胞的反应性筛选 C5-1 杂交瘤细胞系。

20 cDNA 分离、亚克隆和 DNA 构成物

从杂交瘤细胞 cDNA 文库克隆重链(H)和轻链(L)的 cDNA。加入合适的限制位点后，将包括 5'非翻译前导序列的全长 cDNA 均亚克隆入 pGA643 中，将其置于 35S 启动子的转录控制之下，产生 pGA643- γ 和 pGA643- κ 。这些 cDNA 可得自加拿大红十字会, Transfusion Dept.,
25 Sainte-Foy, Quebec.

植物转化、选择和杂交

按照所述方法(Desgagnés 等 1995)，将 pGA643- γ 和 pGA643- κ 引入

根癌农杆菌中，并将 T-DNA 转移入基因型 11.9。不用去雄，使表达 κ 链和 γ 链的转基因植株杂交。根据 RNA 杂交筛选子代，并通过蛋白质印迹法测试双转基因植株的 IgG 含量。

5 RNA 分离和 RNA 印迹分析

按照所述方法(de Vries 等 1988)，从对照苜蓿叶和转基因苜蓿叶分离总 RNA。将总 RNA (15 μ g/道)在 1%琼脂糖-甲醛凝胶上分级分离，并转移至 Hybond-N 尼龙膜上。用由 κ cDNA 的 0.6 kb EcoRI/Hinc II 片段或完整的 γ 链 cDNA 组成的 32 P-标记探针进行杂交。

10

蛋白质提取和免疫检测

将 1 克叶组织在 5 ml 提取缓冲液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 1% β -巯基乙醇)和海沙中匀浆。将匀浆通过 1 层 Miracloth 过滤并经离心澄清(20,000 g, 20 min)。对于稳定性研究，在蒸馏水中进行匀浆和澄清，在匀浆期间通过加入 25 μ g NaOH/g 叶鲜重，使提取物为中性。对于在非还原条件下的研究，在 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl 和 2 mM PMSF 中进行提取。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离提取物，并电转移至硝酸纤维素膜上。封闭膜，并用 Boehringer Mannheim 的 BM 化学发光试剂盒，按照生产商的说明进行缀合的过氧化物酶活性的检测。用兔抗小鼠抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)于 4 $^{\circ}$ C 进行第一次温育。通过用 0.4% β 巯基乙醇处理样品，同时加入或不加入 10 mM 抗坏血酸钠，并于 100 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟，进行重组 IgG 中二硫键的断裂。

15

25 植物 mAb 的纯化和表征

将 20 克叶组织在 100 ml 提取缓冲液 A (50 mM Tris 碱 pH 7.4, 150 mM NaCl, 6 mM PMSF)中匀浆。如上所述将匀浆过滤和澄清。使上清液在 Whatman 纸上过滤，并上样至通过将人 IgG 偶联于 CNBr-

Sepharose (Sigma)制备的亲和柱。该柱用 PBS 洗涤,并用甘氨酸缓冲液(100mM, pH 2.3)洗脱抗体。收集含抗体的流分,用 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)中和并对 PBS 透析。按照所述方法(Bradford, 1976)测定植物纯化 C5-1 量和提取物中存在的蛋白量。

5

血细胞凝集测定

采用旋转管技术(Issit, 1985)研究植物 C5-1 mAb 对致敏红细胞的反应性。通过与人抗-Rh(D)试剂一起温育使 Rh(o)-阳性人红细胞致敏,并用 PBS 洗涤。将 40 μ l 2% (v/v 的 PBS 溶液)致敏红细胞悬浮液加入玻璃试管中的已知浓度的 40 μ l C5-1 mAb 中。将试管混合,并于室温下温育 5 分钟后以 500g 离心 20 秒。目测估计凝集程度。效价为给出阳性凝集反应的最后的稀释度的倒数。

10

ELISA

微量培养板(Costar)的各孔用在碳酸缓冲液(100mM, pH 9.6)中以 5 μ g/ml 稀释的山羊抗小鼠或人 IgG 包被过夜。用含 0.25%酪蛋白的 PBS (PBS-酪蛋白)进行封闭。按照先前关于亲和纯化所述的方法制备植物提取物,并在 PBS-酪蛋白中稀释(1/10 和 1/100)后,直接上样至包被板的各孔中。温育后,洗涤板,用山羊抗小鼠 IgG-过氧化物酶缀合物 (Jackson Imm. Res. Lab)显示 C5-1 的结合。用邻苯二胺(Gibco BRL)底物显示酶缀合物。在微量培养板读板仪(Dynatech MR 5000, Alexandria, Va., USA)上测量 490 nm 下的光密度。

15

20

实施例 1

为了例举苜蓿在蛋白(包括如 mAb 的多聚体蛋白)表达方面的有用性,由高亲和性鼠抗人 IgG mAb (St Laurent 等 1993)文库中选择一种高亲和性 mAb (C5-1)。当用以血型抗体微弱致敏的红细胞测试时, C5-1 mAb 给出的反应性类似于商用兔多克隆试剂。

25

转基因在苜蓿中的整合和表达

按照 Desgagnés 等的方案(1995), 将编码 C5-1 轻链和重链的 cDNA 转移入苜蓿植株中。分别获得 κ 链和 γ 链的 15 株植株和 25 株植株。通过 RNA 杂交监测 κ 链和 γ 链的 mRNA 水平。探针与约 1.25 kbp κ 链 mRNA (图 1A)和 1.75 kbp 的 γ 链 mRNA (图 1B)特异性杂交。苜蓿衍生 mRNA 比鼠 cDNA 约长 250 bp, 表明在这两种情况下, 使用了基因 7 的多腺苷酸化信号。在分析的 29 株 F1 植株中, 发现 7 株同时表达 H 链 cDNA 和 L 链 cDNA。图 1C 显示在随机选择的 F1 子代植株中在 κ cDNA 和 γ cDNA 表达中获得的变异。

5

C5-1 mAb H 链和 L 链在 F1 子代中的表达和装配

对随机选择的表现出同时表达 H 和 L 链 cDNA 的 F1 子代植株, 通过免疫检测分析相应亚基的存在。这一初步筛选表明, 所有这些植株均含有两种 mAb 肽链(数据未显示)。这些双转基因植株之一与相应的亲代植株相比的进一步分析表明, 表达 L 链 cDNA 的单转基因植株不积累显著量的相应肽, 表达 H 链 cDNA 的单转基因植株仅含有 H 链二聚体, 而 F1 子代的双转基因植株有 5 中装配类型, 分子量对应于 H2L2、H2L、H2、HL 和 H 复合物(图 2)。完全装配的植物 IgG (H2L2) 的分子量类似于杂交瘤衍生的 C5-1 mAb。为了打开二硫键, 用 0.4% β 巯基乙醇处理样品。在这些条件下, 所有免疫反应性物质于 100 °C 加热时均沉淀。然而, 当加入抗坏血酸时, 两种组成亚基保持在溶液中, 将其在 SDS-丙烯酰胺凝集上分离。全变性条件下的分离表明, 植物衍生 C5-1 的组成亚基在大小上与杂交瘤衍生 C5-1 相同(数据未显示)。

10

15

20

实施例 2

亲和纯化

苜蓿衍生 C5-1 mAb 的肽含量和稳定性。用亲和纯化从转基因苜蓿植株的叶提取物中回收 C5-1 mAb (图 3A)。用各个 F1 双转基因植株

的叶提取物的定量测定表明, C5-1 抗体水平的范围为总可溶性蛋白的 0.13-1.0%。在还原条件下纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析(图 3B)表明, 通过考马斯蓝染色检测到两条链, 并且其迁移率与得自杂交瘤细胞的对应物相同。这些结果提示, 植物衍生 C5-1 通过糖基化而受到保护的程
5 度与用杂交瘤细胞生产的 C5-1 的程度相同。

实施例 3

在苜蓿中生产并由其提取的转基因蛋白的稳定性

已经表明, 重组 IgG 的蛋白水解发生于烟草(*Nicotiana tabacum*)
10 和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中(Hiatt 等, 1989; Ma 等 1994)。尽管在植物中合成了具有信号肽的非截短的非截短的 IgG, 所述信号肽促进靶向惰性胞外基质(De Wilde 等 1996), 但已经观察到, IgG 可以在提取时被内源蛋白酶降解(Hiatt 等(1989)、During 等(1990)、Ma 等(1995)、Ma 和 Hein (1995)、Schouten (1996))。因为本发明涉及在苜蓿中制备单体蛋白或多聚体蛋白诸如 mAb C5-1, 所以检查了这类制品的稳定性。
15

1) 与烟草提取物相比, 苜蓿提取物中蛋白的稳定性

为了确立蛋白在苜蓿组织的粗提取物中是否稳定, 在苜蓿(11.9 基因型)叶的存在下, 在水中共同提取植物衍生的或杂交瘤衍生的 C5-1,
20 让其于 25°C 温育至多 5 天。在此温育期间, 取出等分样品, 使得可以采用蛋白质分析测定 C5-1 的水平。所述 mAb 与所述来源无关, 在水中制备的苜蓿提取物中是稳定的。显示该实施例前 3 小时的数据, 然后在温育 5 天后观察到相同程度的稳定性。此外, 在图 4 中, 当在多种缓冲液中制备所述 mAb 时, 所述 mAb 是稳定的(数据未显示)。在烟草组织的情况下共同提取 C5-1 的同一试验的结果也示于图 4。可以看出, 在烟草提取物的情况下温育的 C5-1 的水平随时间降低, 在温育 3 小时后不可检测到。因此, 对于从苜蓿中提取转基因蛋白而言, 不需要加入通常加入提取介质中的缓冲盐、抗氧化剂、还原剂、稳定剂、
25

蛋白酶抑制剂等, 以稳定目的转基因蛋白, 诸如例如 mAb C5-1.

5 采用在缺乏上述缓冲液(参见表 1)的情况下与苜蓿共同提取的单克隆抗体(25F5, 人 mAb)和多克隆(hISG, 人免疫球蛋白)抗体, 进一步研究蛋白在苜蓿提取物中的稳定性。结果表明, 在 4 天温育后, 在于室温下贮藏的苜蓿提取物中有显著量的免疫学可检测到的蛋白。

表 1 与苜蓿提取物共同收获的和在苜蓿提取物中温育的蛋白的稳定性

提取后的时间	C5-1 ($\mu\text{g/ml}$)	25F5 ($\mu\text{g/ml}$)	hISG ($\mu\text{g/ml}$)
0	5.2 \pm 0.9	3.4 \pm 0.2	7.7 \pm 0.9
2h	4.9 \pm 0.7	3.9 \pm 0.5	7.1 \pm 0.8
6h	4.1 \pm 0.2	4.0 \pm 0.5	6.0 \pm 0.6
1d	4.6 \pm 0.5	0.8	5.6 \pm 0.3
4d	4.3 \pm 0.1	0.75 \pm 0.03	3.4 \pm 0.1
12d	0.58 \pm 0.07	0.18 \pm 0.02	1.8 \pm 0.1

10 2) 在从转基因苜蓿植株提取期间重组蛋白的稳定性

15 通过将双转基因植物叶在纯水中匀浆, 也证明了粗提取物中转基因 C5-1 的稳定性。这类叶提取物具有小但显著的缓冲能力, 这是在含 100 g 新鲜叶的提取物中以约 0.4 pH 单位(pH 6.5-8.5)/摩尔 NaOH 确立的。结果表明, 这些提取物可以于室温保持, 而至少 2 小时 pH 不显著改变。作为转基因 C5-1 的提取剂, 单独的水与含蛋白酶抑制剂的缓冲液(缓冲液 A)一样好, 在该基本提取系统中, C5-1 于室温下保持 100% 稳定至少 2 小时(表 2)。

表 2 - 植物 C5-1 在粗蛋白提取物中的稳定性

提取后的时间	总蛋白(mg/g)	C5-1* ($\mu\text{g/ml}$)
对照	2.21	2.40
0 小时	2.47	2.45
1 小时	2.32	2.45
2 小时	2.24	2.62

*通过鼠 IgG 特异性 ELISA 测定

5 3) 蛋白在收获的植物组织中的稳定性

为了确定将苜蓿地上部分干燥对 C5-1 水平和/或从转基因气生组织提取 C5-1 的能力是否有影响, 收获了一株双转基因植株, 让其于 25 °C、20% 的相对湿度下干燥至多 30 天。在该干燥时期结束时, 叶材料的含水量低于 20%, 这是在大田条件下观察到的水平。在该干燥期间收获等量的叶材料, 对其提取并用蛋白质分析测定 C5-1 水平。正如在显示前 5 天数据的图 5 中观察到的, 对于来自正在干燥或已经干燥的苜蓿叶的可提取转基因蛋白的量, 没有观察到降低。当收获植株并在大田条件下保持时, 在干燥 30 天后观察到相同的结果。

15 4) C5-1 在给予小鼠后的稳定性

给小鼠静脉内给予等量的苜蓿衍生 C5-1 或杂交瘤衍生的 C5-1, 检测在 28 天的时期内获得的血浆样品中的蛋白的存在。该试验的结果示于图 6。给予的 C5-1 蛋白在小鼠中的半衰期对于杂交瘤衍生蛋白或植物衍生蛋白是相同的。这提示, 植物衍生 C5-1 通过糖基化受到保护, 其程度与杂交瘤衍生蛋白相似。在 5 天时间内注射的蛋白损失 50% 后, 剩余的蛋白在接下来的 20 天时期内再下降 25%。评价时期结束时, 在小鼠内可检测到原始供应的蛋白的 25%。

5) 苜蓿繁殖体中蛋白的稳定性

为了确立转基因表达在转基因苜蓿繁殖体内的稳定性，检查 15 株得自 F1 子代的两种基因型的叶组织中的 C5-1 浓度。通过在节间茎节(stem section)上诱导生根，制备繁殖体。分析来自这两种基因型的 15 株再生植株的 C5-1 含量，将其与亲代材料中的 C5-1 水平比较。表 3 所示数据显示这一试验的结果，并表明 C5-1 水平在亲代材料和繁殖的材料中观察到的水平之间保持不变。

表 3 - 可提取的 C5-1 在世代之间的稳定性

基因型 2		基因型 3	
原材料*		原材料*	
14.4 $\mu\text{g/g}$ 叶		14.4 $\mu\text{g/g}$ 叶	
1	: 21.2 $\mu\text{g/g}$	16	: 13.4 $\mu\text{g/g}$
2	: 17.9 $\mu\text{g/g}$	17	: 18.2 $\mu\text{g/g}$
3	: 16.9 $\mu\text{g/g}$	18	: 19.7 $\mu\text{g/g}$
4	: 18.5 $\mu\text{g/g}$	19	: 15.1 $\mu\text{g/g}$
5	: 17.8 $\mu\text{g/g}$	20	: 14.5 $\mu\text{g/g}$
6	: 15.0 $\mu\text{g/g}$	21	: 15.6 $\mu\text{g/g}$
7	: 16.1 $\mu\text{g/g}$	22	: 14.6 $\mu\text{g/g}$
8	: 14.4 $\mu\text{g/g}$	23	: 12.4 $\mu\text{g/g}$
9	: 21.8 $\mu\text{g/g}$	24	: 15.6 $\mu\text{g/g}$
10	: 14.2 $\mu\text{g/g}$	25	: 17.5 $\mu\text{g/g}$
11	: 18.4 $\mu\text{g/g}$	26	: 17.4 $\mu\text{g/g}$
12	: 18.2 $\mu\text{g/g}$	27	: 18.0 $\mu\text{g/g}$
13	: 17.3 $\mu\text{g/g}$	28	: 16.8 $\mu\text{g/g}$
14	: 15.1 $\mu\text{g/g}$	29	: 17.2 $\mu\text{g/g}$
15	: 12.7 $\mu\text{g/g}$	30	: 14.6 $\mu\text{g/g}$
17.0 \pm 2.53 $\mu\text{g/g}$		16.0 \pm 1.99 $\mu\text{g/g}$	

10

*在先前的试验中已经测定了原始值为 14.4

实施例 4

抗原结合活性和血细胞凝集素活性

用 ELISA 试验进一步测试植物衍生 C5-1 mAb 的抗原结合能力。来自生产 C5-1 的植株的叶提取物的连续稀释液用于该试验。表 4A 显示了用 1/10 稀释样品获得的光密度值。结果表明，植物 C5-1 mAb 被抗小鼠 IgG 抗体识别，提示植物产生的抗体的总体构象为 IgG 的构象。此外，植物 C5-1 特异性地识别人 IgG，表明 H 链和 L 链正确折叠形式抗原结合位点。初步试验表明，C5-1 植物提取物可以特异性地使以人 IgG 致敏的红细胞凝集。对亲和纯化的物质的更完全的表征与杂交瘤衍生 C5-1 mAb 平行进行。结果(表 4B)表明，植物衍生 C5-1 mAb 特异性地使抗 D-致敏人 RBC 凝集，于 6 μ g/ml 下产生完全的(4+)反应，这与用杂交瘤衍生的 C5-1 mAb 观察到的结果相似。

用抗鼠 IgG 作为包被抗体的 ELISA 测定也用来测定亲代转基因植株的反应性。表 5A 表明，在 L-单转基因植株中没有检测到信号，而在含有 H 链的植株中检测到信号。这些结果用来确定粗提取物中免疫反应性物质的量。然后，在用人 IgG 包被的孔中测试已知量的粗提取物的反应性(表 5B)。这第二个试验表明，单独的重链不与人 IgG 反应。它也表明，植物 H2L2 的比活与来自杂交瘤细胞的 C5-1 的比活相似。通过测定平衡下的解离常数，比较植物衍生抗体对其抗原的真正的亲和力和杂交瘤衍生抗体的亲和力。植物衍生 C5-1 和杂交瘤衍生 C5-1 的 K_D 分别为 4.7×10^{-10} M 和 4.6×10^{-10} M。

表 4 - 植物衍生 C5-1 mAb 的反应性. (A) ELISA 测定;
(B) 血细胞凝集

A)	490 nm 下的光密度	
	固定化抗体	
测试的材料	山羊抗小鼠	人 IgG
对照植株的 提取物(1/10)	0.000±0.000	0.000±0.000
转基因植株的 提取物(1/10)	0.243±0.007	0.531±0.014
C5-1 杂交瘤 上清液(1/10)	0.414±0.034	0.643±0.035

B)	血细胞凝集素强度	
	未包被的 RBC	抗-D-包被的 RBC
无	-	-
对照抗人 IgG 试剂	-	++++
杂交瘤 C5-1 (6µg/ml)	-	++++
植株 C5-1 (6 µg/ml)	-	++++

表 5 - 亲代和 F1 转基因植株的免疫反应性(A)和比活(OD/100ng)(B)

提取物	光密度	$\mu\text{g/ml}$
来自杂交瘤细胞的 IgG	0.376 ± 0.008	0.28^*
L (1/1)	0.000	--
H (1/4)	0.560 ± 0.049	$0.10 \pm 0.01^{**}$
HL (F1, 1/6)	0.328 ± 0.027	0.25 ± 0.02

提取物	光密度	比活
来自杂交瘤细胞的 IgG	0.332 ± 0.032	0.235 ± 0.020
L (1/1)	0.000	--
H (1/4)	0.000	--
HL (F1, 1/6)	0.334 ± 0.011	0.267 ± 0.080

* 来自纯化的流分, $0.28 \mu\text{g/ml}$

5 ** 根据 H_2L_2 结构计算的

实施例 5

植物 C5-1 的大规模纯化

10 将 300 克植株材料在 1.2 L 含 50 mM 硼酸盐和 4 M NaCl 的 pH 9.0 提取缓冲液中匀浆。匀浆通过在包酪布上过滤澄清。然后将该匀浆通过向上流动至 Streamline rProtein A 基质(Pharmacia)的膨胀床上直接上样。于 4°C 以 7 ml/min 的速率上样。该柱用 250 ml 提取缓冲液洗涤, 用 50 mM 柠檬酸钠、50 mM 磷酸钠和 300 mM NaCl pH 3.0 洗脱。回收流分(1.5 ml), 立即用 $100 \mu\text{l}$ 1.5 M Tris pH 8.8 中和。

15 选择膨胀床吸附(STREAMLINE™ r Protein A), 使得可以将部分澄清的含胶体物质的植物提取物以高流速上样。采用该技术, 由非澄

清的植物粗提取物纯化植物 C5-1, 通过在 SDS-PAGE 凝胶上的考马斯蓝染色, 显示纯化的植物 C5-1 作为单一肽(图 3B)。

所有科学出版物和专利文件均通过引用结合到本文中。

5 已经通过优选实施方案描述了本发明。然而, 对于本领域技术人员显而易见的是, 在不偏离以下权利要求所述的本发明范围的情况下, 可以进行多种变化和修改。

参考文献

- 10 An, G., Ebert, P.R.和 Ha, S.B. 1988. A3 第 1 页 - *Plant Mol. Biol. Manual*, Gevin, S. B.和 Shilperoot, R.A. (编辑) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Austin S., Bingham E.T. 1997 转基因苜蓿作为生产酶的生物反应器的潜力应用. *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. McKersie B.D.和 Brown D.C.W. (编辑) CAB International
- 15 Bradford, M.M. 1976. 利用蛋白染料结合的原理定量测定微克量蛋白的快速而敏感的方法. *Anal Biochem* 72:248-254.
- De Wilde, C., De Neve, M., De Rycke, R., Bruyns, A.-M., De Jaeger, G., Montagu, M.V., Depicker, A.和 Engler, G. 1996. 完整的抗原结合 MAK33 抗体和 Fab 片段在拟南芥的细胞内空间积累. *Plant*
- 20 *Science*. 114:233-241.
- de Vries, S., H.和 Bisseling, T. 1988. B6 ppl - *Plant Mol. Biol. Manual*, Gevin, S. B.和 Shilperoot, R. A. (编辑) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Desgagnés, R., Laberge, S., Allard, G., Khoudi, H., Castonguay, Y., Lapointe, J., Michaud, R.和 Vézina, L.-P. 1995. 苜蓿(*Medicago sativa*)商用育种系的遗传转化. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 42:129-140.
- 25 During, K., Hippe, S., Kreuzaler, F.和 Schell, J. 1990. 功能性单克隆抗体

- 在转基因烟草中的合成和自我装配. *Plant Mol. Biol.* 15:281-293.
- Geierson 和 Corey (1988), *Plant Molecular Biology*, 第 2 版.
- Hiatt, A., Caferky, R. 和 Bowdish, K. 1989. 在转基因植物中生产抗体.
5 Nature 342:76-78.
- Hiatt, A. 1990. 在植物中生产的抗体. *Nature* 344:469-470
- Hiatt, A. 和 Pinney, R. 1992. 第 159-176 页. *Antibody expression and engineering A practical guide* Borrebaeck, C. A. K. (编辑) Freeman W.H. and company, New York.
- 10 Issit, P. D. 1985. *Applied blood group serology*. Montgomery Scientific Publications Miami.
- Jones, B.A. 等 1995 苜蓿和红三叶草中蛋白水解的特征鉴定. *Crop Sc.* 35:537-541.
- Ma. J. K.-C., Lechner, T., Sabtila, P., Fux, C.I. 和 Hiatt, A. 1994. 在转基因烟草植株中具有 IgG1 和 IgA 重链结构域的单克隆抗体的装配.
15 Eur. J. Immunol. 24:131-138.
- McKersie, B. D. 和 Bowley, S. R. 1993. 第 231-255 页. *Synseed. Redenbaugh* (编辑) CRC Press.
- Miele, L. 1997 植物作为生物药物的生物反应器: 管理上的考虑.
20 TIBTECH 15:45-50.
- Morris P. 和 Robbins M.P. 1997 在饲用豆科植物中操作浓缩鞣质. *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. McKersie B.D. 和 Brown D.C.W. (编辑) CAB International.
- Papadopoulos, Y.A., McKersie, B.D. 1983 在 6 种饲料物种萎蒿和青贮
25 期间蛋白降解的比较. *Can. J. Plt. Sc.* 63:903-912.
- St Laurent, M., Marcil, A., Verrette, S. 和 Lemieux, R. 1993. 在常规血细胞凝集试验中人 IgG 特异性鼠单克隆抗体在检测弱血型抗体中的功能协作. *Vox Sang.* 64:99-105.
- Wang, H.Y. 和 Imanaka, T. 1995. 抗体表达和工程. *American chemical*

society, Washington, DC.

Weissbach 和 Weissbach, (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*,
Academy Press, New York VIII, 第 421-463 页。

Whitelam, G. C.和 Cockburn, W. 1996. 转基因植物中的抗体表达。
5 Trends in Plant Science 8:268-272.

Wongsamuth 和 Doran, 1997. 由烟草毛根生产单克隆抗体。
Biotechnology and Bioengineering. 54, 401-415.

Wright, A., Shin, S-U 和 Morrison, S.L. 1992. 基因工程抗体: 进展和展
望。 Crit. Rev. Immunol. 12, 125-168.

10

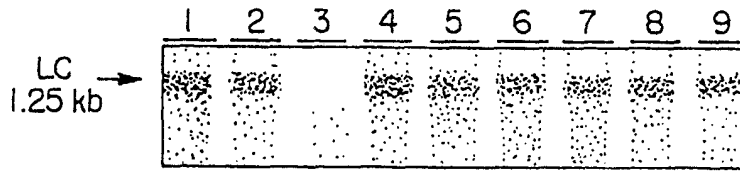


图 1a

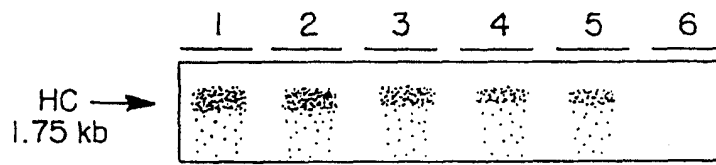


图 1b

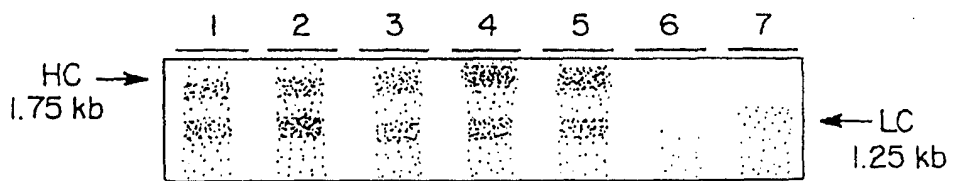


图 1c

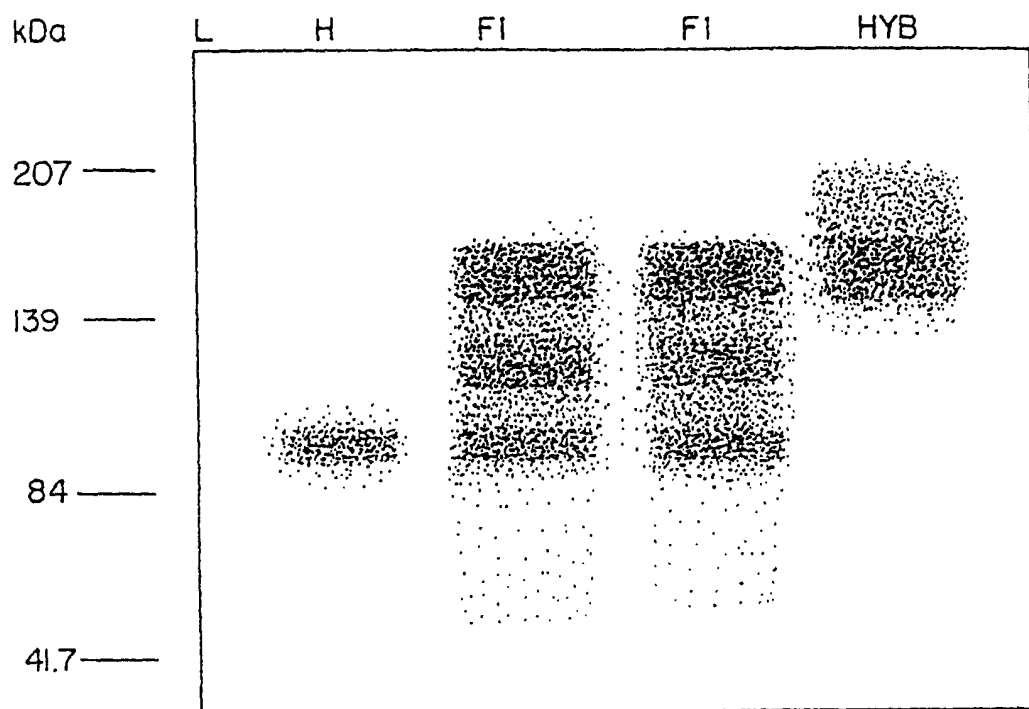


图 2

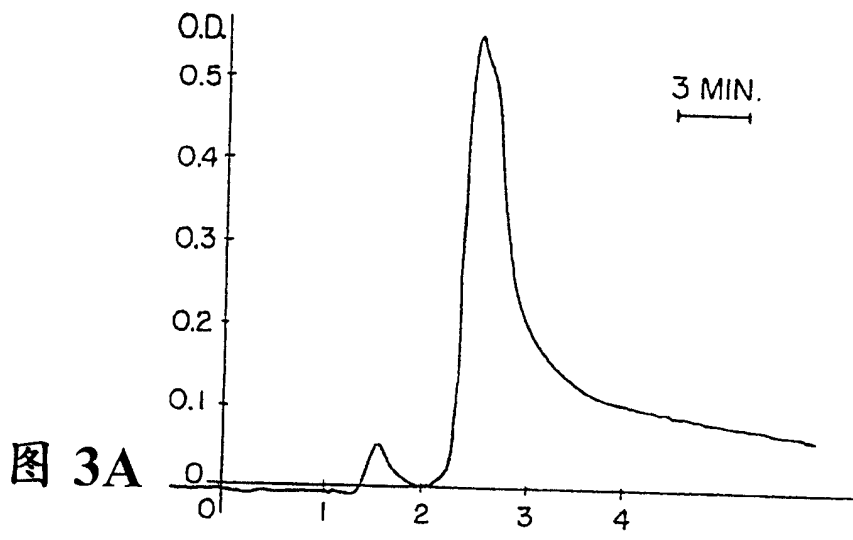


图 3A

图 3B

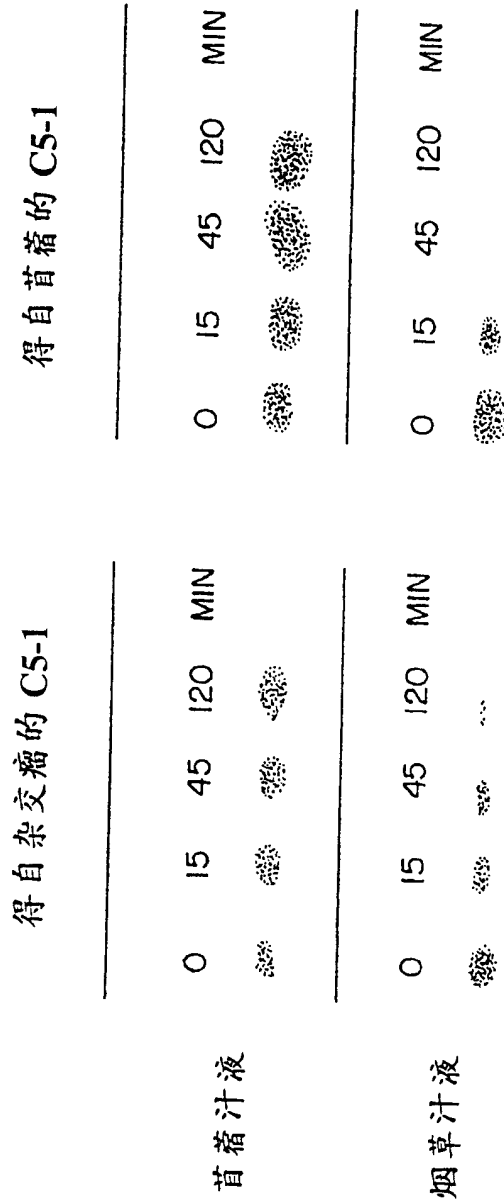
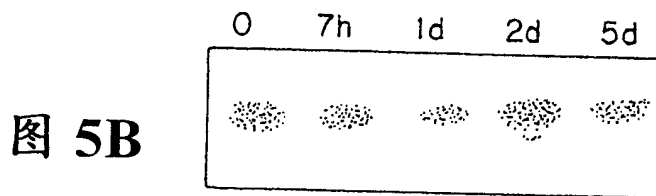
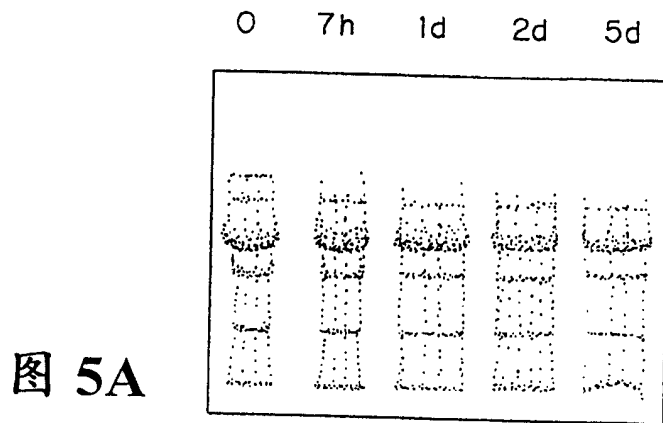


图 4



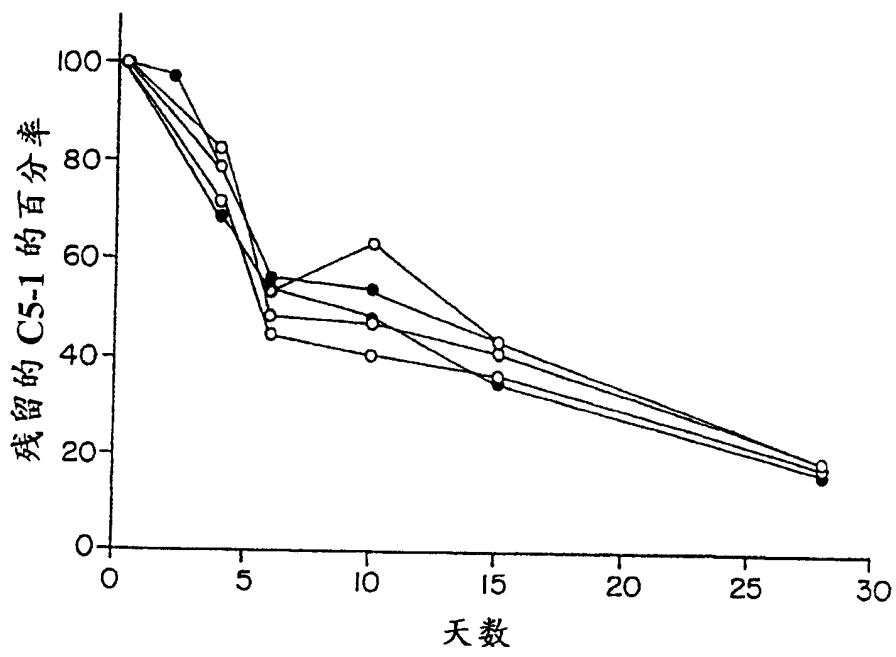


图 6